

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Funcionalización con base estructural de nanopartículas
virales derivadas del "Virus del mosaico del nabo" con fines
biotecnológicos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carmen Yuste Calvo

Director

Fernando Ponz Ascaso

Madrid
Ed. electrónica 2019



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

Programa de Doctorado en Microbiología y Parasitología
Facultad de Ciencias Biológicas

TESIS DOCTORAL:

**“Funcionalización con base estructural de
nanopartículas virales derivadas del *Virus del
mosaico del nabo* con fines biotecnológicos.”**

AUTORA:

Carmen Yuste Calvo

Lda. en Biología

DIRECTOR:

Fernando Ponz Ascaso

Dr. en CC. Químicas

MADRID, 2019



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Doña CARMEN YUSTE CALVO, estudiante en el Programa de Doctorado de MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA, de la Facultad de CIENCIAS BIOLÓGICAS de la Universidad Complutense de Madrid, como autora de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada: “Funcionalización con base estructural de nanopartículas virales derivadas del *Virus del mosaico del nabo* con fines biotecnológicos” y dirigida por FERNANDO PONZ ASCASO.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril. Por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 20 de mayo de 2019

Fdo. Carmen Yuste Calvo

“La mayoría de la gente dice que es el intelecto lo que hace a un gran científico. Están equivocados: es el carácter.”

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, y como no podría ser de otra manera, quería agradecer a mi Director de Tesis el Profesor Fernando Ponz, por darme la oportunidad de formarme como investigadora en un campo tan enriquecedor durante los últimos 6 años. Gracias por guiarme para sacar adelante un trabajo del que sentirme orgullosa. También agradecer enormemente a la Dra. Flora Sánchez por permitirme pasar estos años absorbiendo la sabiduría que emana. Me siento tremendamente afortunada por haber tenido unos mentores tan extraordinarios.

Gracias a la Universidad Complutense de Madrid. Me siento enteramente Complutensis después de obtener en esta universidad los títulos de Licenciatura y Máster, a falta de tener en mis manos el de Doctorado. El esfuerzo se ha visto recompensado con una estupenda formación. Y por supuesto gracias a mi tutora la Dra. Laura Benítez Rico, por el apoyo y la ayuda que he recibido los años de mi Tesis.

Gracias a todos los compañeros que han pasado por este laboratorio, con los que he compartido más o menos horas, pero sí infinitos buenos momentos. Ivonne, Silvia, Edith, Luci y todos los pequeños de Máster y Grado: gracias por hacer que ir cada día a trabajar fuese un regalo. No sois para mí compañeros de trabajo, sois mi familia del labo.

A todos mis amigos en general, de Segovia y de Madrid, porque cuando veía las cosas con más sombras que luces, siempre teníais una palabra de apoyo (o una cerveza fresquita) para sacarme la energía de donde fuera. Sí que debo ser inteligente para rodearme de gente tan maravillosa, y espero seguir teniéndooos a mi lado en la próxima etapa de mi vida.

A mi familia postiza favorita, especialmente a Félix. Estoy aquí gracias a ti y nunca te lo agradeceré lo suficiente.

A Víctor. Tu infinita paciencia ha sido requisito indispensable para poder llegar a buen puerto. Gracias por haber sido la constante más importante, por ponerme las cartas sobre la mesa cuando lo necesitaba, por quererme hasta cuando me odiabas... Compartir mi vida contigo es la mejor decisión que he tomado jamás. Y a Pepa y Dora, nuestras pequeñas peludas, por pasar por todo esto a nuestro lado y acompañarme en las largas jornadas de escritura.

Por último, aunque no haya palabras para ello, necesito agradecer a mi familia todo lo que han hecho y siguen haciendo cada día por mí, especialmente a mis

padres Carmen y Mariano, y a mi hermano Gonzalo. Gracias por confiar en mí, por valorar cada ápice del esfuerzo que he depositado en esta Tesis, y por hacer grandes esfuerzos conmigo para alcanzar esta meta tan preciosa. Os quiero muchísimo. A ti, mamá, gracias por ser mi mayor admiradora y por vivir a través de mis éxitos, espero que te sientas casi tan orgullosa de mí como yo lo estoy de ti.

A todos y cada uno de vosotros y a todos los que me pueda dejar en el tintero GRACIAS. Nada de esto habría sido posible sin vuestro apoyo y cariño, y lo valoraré SIEMPRE.

ABREVIATURAS

3D	– Tres dimensiones
A _x	– Absorbancia a una longitud de onda de X nm
ADN	– Ácido desoxirribonucleico
Amp	– Ampicilina
AMPs	– Péptidos antimicrobianos (Anti-Microbial Peptides)
AP	– Fosfatasa alcalina
ARN	– Ácido ribonucleico
BCIP	– 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato disódico
BEVS/IC	– Sistema de expresión de Baculovirus/ Células de insectos
BSA	– Albúmina de suero bovino
CPMV	– Cowpea mosaic virus (<i>Virus del mosaico de la carilla</i>)
CP	– Proteína de la cápsida
CrioME	– Criomicroscopía electrónica
DO _x	– Densidad óptica a una longitud de onda de X nm
dpa	– Días postagroinfiltración
dpi	– Días postinoculación
DSS	– Dextrano sulfato de sodio
DTT	– Ditioneitol
EDTA	– Ácido etilendiaminotetraacético
EE	– Electroestático
EII	– Enfermedad inflamatoria intestinal
ELISA	– Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
GA	– Glutaraldehído
GFP	– Proteína verde fluorescente (Green fluorescent protein)
HF	– Alta fidelidad
Hsp60	– Proteína de choque térmico 60 (Heat Shock Protein 60)
I-AEDANS	– Ácido 5-[2-[(2-iodo-1-oxoetil)amino] etilamino]-1-naftalensulfónico
Ig	– Inmunoglobulina
ISEM	– Microscopía electrónica de inmunoabsorción

Km – Kanamicina
 LB – Luria-Bertani
 MAb – Anticuerpo monoclonal
 NBC – Azul de cloruro de nitroterazolio
 NHS – N-hidroxisuccinimida
 nt – Nucleótido
 o/n – Durante la noche (overnight)
 ORF – Marco de lectura abierto
 p/v – Peso/volumen
 PAGE – Electroforesis en gel de poliacrilamida
 PapMV – *Papaya mosaic virus* (*Virus del mosaico de la papaya*)
 PBS – Tampón fosfato salino
 PCR – Reacción en cadena de la polimerasa
 PDB – Base de datos de proteínas
 pEAQ – Plasmido "Easy and Quick"
 PEG – Polietilenglicol
 PepMV – *Pepino mosaic virus* (*Virus del mosaico del pepino*)
 pI – Punto isoeléctrico
 PLA – Ácido poliláctico
 PMMV – *Pepper mild mottle virus* (*Virus del moteado suave del pimiento*)
 PSA – Persulfato amónico
 PVX – *Potato virus X* (*Virus X de la patata*)
 Rif – Rifampicina
 rpm – Revoluciones por minuto
 SAP – Fosfatasa alcalina de gamba ártica
 SDS – Dodecil sulfato de sodio
 SMV – *Soybean mosaic virus* (*Virus del mosaico de la soja*)
 Sulfo-SIAB – Sulfosuccinimidil (4-iodoacetil) aminobenzoato sódico
 TA – Temperatura ambiente
 TEM – Microscopía electrónica de transmisión
 TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
 TMV – *Tobacco mosaic virus* (*Virus del mosaico del tabaco*)

Tpn I – Taquipesina I

TuMV – *Turnip mosaic virus* (*Virus del mosaico del nabo*)

V/cm – Voltios por centímetro

v/v – Volumen/volumen

VEGFR3 – Receptor 3 del factor de crecimiento del endotelio vascular

VIP – Péptido intestinal vasoactivo

VLP – Nanopartícula tipo virus

VNP – Nanopartícula viral

WB – Hibridación tipo “western” (western blot)

WMV – *Watermelon mosaic virus* (*Virus del mosaico de la sandía*)

wt – Tipo silvestre, sin modificar (wild type)

Aminoácidos		
Código (1 letra)	Código (3 letras)	Aminoácido
A	Ala	Alanina
R	Arg	Arginina
N	Asn	Asparagina
D	Asp	Ácido aspártico
C	Cys	Cisteína
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutámico
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
K	Lys	Lisina
M	Met	Metionina
F	Phe	Fenilalanina
P	Pro	Prolina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina
V	Val	Valina

PUBLICACIONES

Durante la realización de la presente Tesis, se han publicado los siguientes artículos de investigación con autoría de la doctoranda, incluidos como material suplementario.

Cuenca, S., Mansilla, C., Aguado, M., Yuste-Calvo, C., Sánchez, F., Sánchez-Montero, J.M., Ponz, F. (2016) Nanonets derived from *Turnip mosaic virus* as scaffolds for increased enzymatic activity of immobilized *Candida antarctica* lipase B. *Front Plant Sci* **7**, 464.

Yuste-Calvo, C., González-Gamboa, I., Pacios, L.F., Sánchez, F., Ponz, F. (2019) Structure-based multifunctionalization of mlexuous elongated viral nanoparticles. *ACS Omega* **4**, 5019-5028.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

En el dispositivo USB adjunto, se incluyen varios archivos como material suplementario:

- Archivo PDB de la estructura del virión de WMV, con su código original (5odv).
- Archivo PDB de la estructura de TuMV modelada a partir de la de WMV (TuMV_modelo por homología con WMV).
- Archivo PDB de la estructura de la CP de TuMV obtenida por CriOME (TuMV_virión_subunidad)
- Archivo PDB de la estructura del virión de TuMV obtenida por CriOME (TuMV_virión_polímero)
- Archivo PDB de la estructura de las VLPs de TuMV obtenidas por CriOME, referentes a dos modelos: A y B (TuMV_VLP_A y TuMV_VLP_B)
- Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la CP de cuarenta y nueve potyvirus en PDF, donde se han indicado con distinta intensidad de color las regiones más conservadas (de gris a magenta, alcanzando el morado en el nivel máximo).
- Artículos publicados durante la realización de la Tesis en los que la doctoranda posee autoría.

TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas.	31
Tabla 2. Anticuerpos.	32
Tabla 3. Enzimas de restricción.	33
Tabla 4. Proteínas y péptidos.	33
Tabla 5. Conectores y compuestos para conjugación química.	34
Tabla 6. Composición del medio LB.	34
Tabla 7. Composición del medio Fi broth.	35
Tabla 8. Composición del medio TfB1.	35
Tabla 9. Composición del medio TfB2.	36
Tabla 10. Composición del medio MMA.	36
Tabla 11. Composición del medio universal.	36
Tabla 12. Composición del medio mínimo M9.	37
Tabla 13. Composición del medio N1.	37
Tabla 14. Condiciones de crecimiento bacteriano.	38
Tabla 15. Cebadores.	45
Tabla 16. Porcentaje de poliacrilamida en electroforesis de ADN.	49
Tabla 17. Composición de geles de poliacrilamida para electroforesis de ADN.	49
Tabla 18. Composición de la reacción de PCR.	50
Tabla 19. Programa de PCR.	50
Tabla 20. Cebadores para PCR de colonias.	52
Tabla 21. Cebadores para la secuenciación.	52
Tabla 22. Construcciones y cebadores de VLPs delecionadas en el dominio N-terminal y VLP sin modificar.	55
Tabla 23. Construcciones y cebadores de VLPs delecionadas en el dominio C-terminal.	56
Tabla 24. Composición geles de poliacrilamida para electroforesis de proteínas.	64
Tabla 25. Ensayos de ELISA indirecto.	65
Tabla 26. Tratamientos antimicrobianos.	69
Tabla 27. Deleciones de la CP de TuMV.	96
Tabla 28. Cantidades empleadas en el tapizado del ELISA comparativo.	139
Tabla 29. Cantidades empleadas en los ensayos en medio líquido.	159
Tabla 30. Composición de nanomallas empleadas en ensayos antimicrobianos en medio líquido.	161

FIGURAS

Figura 1. Funcionalización de nanopartículas virales en el campo biomédico	9
Figura 2. Virus más empleados como VNPs en nanobiotecnología	10
Figura 3. Diferencias entre VLPs y viriones	12
Figura 4. Características relevantes y funciones propuestas de las proteínas de potyvirus	18
Figura 5. Representación esquemática de la producción de viriones de TuMV mediante el vector infeccioso p35Tunos-Vec01-NAT1	20
Figura 6. Representación esquemática de la producción de VLPs de TuMV mediante el sistema de expresión pEAQ.	21
Figura 7. Representación esquemática de la conjugación química en VNPs mediante dos conectores heterobifuncionales.	23
Figura 8. Mapa de pENTR™/D-TOPO®	41
Figura 9. Mapa de pCR™-Blunt II-TOPO®	42
Figura 10. Mapa de pEAQ-HT-Dest1	43
Figura 11. Mapa del vector p35Tunos-Vec01-NAT1	44
Figura 12. Marcadores de ADN para electroforesis en geles de agarosa.....	48
Figura 13. Fragmento del clon infeccioso p35Tunos-Vec01-NAT1 desde las dianas de restricción <i>Mlu</i> I y <i>Sal</i> I	56
Figura 14. Diseño de genes sintéticos para viriones con la CP delecionada en el dominio C-terminal.	57
Figura 15. Alineamiento de las secuencias de las CPs de WMV y TuMV	77
Figura 16. Homología entre las estructuras de la CP de TuMV del modelo desarrollado a partir de la CriOME de WMV (rojo) y la CriOME del propio TuMV (verde)	78
Figura 17. Estructura ensamblada de TuMV	79
Figura 18. Interacciones entre subunidades desde distintos puntos de vista.....	80
Figura 19. Potencial electrostático de la CP de TuMV	81
Figura 20. Interacción de la CP con el ARN del virión	82
Figura 21. Modelos de la estructura de VLPs.....	84
Figura 22. Localización de los dominios N- y C-terminales de la CP en TuMV	94
Figura 23. Localización del primer y último aminoácidos que aparecen representados en la estructura del virión	95
Figura 24. ELISA anti-poty de extractos de proteínas en hojas agroinfiltradas con las distintas construcciones.....	97
Figura 25. Micrografías de VLPs purificadas con la CP delecionada y sin deleccionar....	98
Figura 26. Infección de <i>Nicotiana benthamiana</i> por el aislado UK1 con GFP	100

Figura 27. Sintomatología desarrollada en ejemplares de <i>Nicotiana benthamiana</i> inoculados con las distintas construcciones. Barra de escala correspondiente a 2 cm.	101
Figura 28. Análisis de la fluorescencia presente en hojas inoculadas y jóvenes de las plantas inoculadas con las distintas construcciones.....	101
Figura 29. Micrografías de VLPs de TuMV con mutación puntual C140S.	113
Figura 30. Estructura de TuMV y localización de los residuos de cisteína y lisina	115
Figura 31. Estrategias de funcionalización	116
Figura 32. Estabilidad estructural de VNPs de TuMV en diferentes tampones a distintos pHs.....	117
Figura 33. Estabilidad estructural de VNPs de TuMV a 37°C	118
Figura 34. Derivatización química de cisteína	120
Figura 35. Derivatización química en la región interna de las nanopartículas con un péptido.....	122
Figura 36. ELISA de sensibilidad de las VNPs conjugadas con VIP en la región interna.....	122
Figura 37. Ligación de Staudinger a VNPs de TuMV	123
Figura 38. Derivatización química de lisina	124
Figura 39. Derivatización por conjugación química en lisinas de un péptido en la superficie vira	125
Figura 40. ELISA de sensibilidad de las VNPs conjugadas con VIP en la superficie de la partícula.....	125
Figura 41. Caracterización de la doble y triple funcionalización	126
Figura 42. Caracterización de VLPs de Hsp60 (con péptido 301-320)	138
Figura 43. ELISA comparativo Hsp60-VLP con respecto a la Hsp60 completa empleando anticuerpos mono y policlonales con distintas cantidades en el tapizado	139
Figura 44. Comparación entre Hsp60-VLPs y la proteína Hsp60 completa.....	140
Figura 45. Comparación de Hsp60-VLP respecto al péptido libre.....	141
Figura 46. ELISA para la detección de autoanticuerpos anti-Hsp60.	143
Figura 47. Seguimiento del progreso de la inducción de la patología mediante medidas de peso corporal y niveles de granulocitos en sangre	144
Figura 48. Niveles de autoanticuerpos en el modelo de la EI inducida por DSS	145
Figura 49. Caracterización de VLPs-Tpn I	157
Figura 50. Caracterización de la conjugación química del péptido Tpn I a las lisinas de la CP de TuMV	158
Figura 51. Actividad antimicrobiana de Tpn I libre y conjugada a lisinas en VNPs mediante ligación de Staudinger.....	160
Figura 52. Actividad antimicrobiana de Tpn I libre y conjugada en forma de agregados de Tpn I o formando nanomallas con VNPs mediante conjugación con GA	162

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	VII
ABREVIATURAS	IX
PUBLICACIONES.....	XIII
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	XV
TABLAS	XVII
FIGURAS.....	XIX
ÍNDICE	XXIII
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN	5
1. Nanobiotecnología	7
2. Virus como nanopartículas	9
3. Virus de plantas en nanobiotecnología.....	12
4. Aplicaciones de VNPs de plantas en nanobiotecnología.....	14
5. Potyvirus	17
5.1. Funcionalización de viriones de TuMV por fusión genética.....	19
5.2. Funcionalización de VLPs de TuMV por fusión genética.....	21
5.3. Funcionalización de VNPs por conjugación química.....	22
II. OBJETIVOS.....	25
III. MATERIAL Y MÉTODOS	29
1. Material biológico	31
a. Cepas bacterianas.....	31
b. Virus.....	31

c.	Plantas.....	31
d.	Modelos animales.....	32
e.	Anticuerpos	32
f.	Enzimas de restricción	33
g.	Proteínas y péptidos	33
h.	Conectores y compuestos químicos para conjugación química	34
2.	Mantenimiento de los microorganismos	34
a.	Medios de cultivo.....	34
b.	Condiciones de crecimiento.....	38
c.	Condiciones de almacenamiento.....	38
3.	Preparación de células competentes y transformación de cepas	39
a.	Preparación de <i>E. coli</i> DH5a.....	39
b.	Preparación de <i>A. tumefaciens</i> LBA4404	39
c.	Transformación de <i>E. coli</i>	40
d.	Transformación de <i>A. tumefaciens</i>	40
4.	Técnicas de Biología Molecular y ADN recombinante	41
a.	Plásmidos	41
b.	Cebadores	45
c.	Clonación en pENTR/D-TOPO®.....	45
d.	Clonación en PCR-Blunt II-TOPO®.....	46
e.	Clonación en pEAQ-HT-Dest1	46
f.	Clonación en p35Tunos-Vec01-NAT1	47
g.	Extracción de ADN plasmídico	47
h.	Cuantificación de ADN	47
i.	Electroforesis de ADN en gel de agarosa	48
j.	Electroforesis de ADN en gel de poliacrilamida	49
k.	Amplificación de ADN	50
l.	Digestión de ADN con enzimas de restricción.....	51
m.	Purificación de fragmentos de ADN.....	51
n.	Desfosforilación de fragmentos de ADN.....	51
o.	Ligación de fragmentos de ADN.....	51

p. PCR de colonias	52
q. Secuenciación de ADN	52
5. Producción y purificación de VNPs	53
a. Infección de plantas	53
b. Agroinfiltración de plantas.....	53
c. Purificación de VNPs	54
6. Diseño de VNPs modificadas genéticamente.....	55
a. VNPs delecionadas en el dominio N-terminal	55
b. VNPs delecionadas en el dominio C-terminal	56
c. VNPs de Hsp60	57
d. VNPs de VIP	58
e. VNPs de Tpn I	58
7. VNPs derivatizadas por conjugación química	59
7.1. Conjugación química a cisteína	59
a. VNPs conjugadas con compuesto fluorescente.....	59
b. Conjugación de un compuesto biotinilado	59
c. Conjugación de VIP a VNPs	60
7.2. Conjugación química a lisinas	60
a. Conjugación a VNPs de compuesto fluorescente	60
b. Conjugación indirecta de compuesto fluorescente a VNPs.....	61
c. Conjugación de VIP a VNPs	61
d. Conjugación química de macromoléculas no portadoras de grupo azido.....	61
7.3. Multiderivatización de VNPs	62
8. Formación de nano/micromallas	62
9. Manipulación y caracterización de VNPs	63
a. Extracción de proteína total de tejido vegetal.....	63
b. Determinación de la concentración de proteínas	63
c. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	63
d. Hibridación en membrana e inmunodetección (Western-Blot)	64

e. Hibridación directa en membrana e inmunodetección (Dot-Blot)	65
f. ELISA indirecto.....	65
g. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	66
h. Microscopía electrónica de inmunoadsorción (ISEM)	67
10. Criomicroscopía electrónica y procesamiento de imagen	67
11. Modelo atómico para la CP de TuMV	68
12. Ensayos de actividad antimicrobiana.....	68
13. Programas informáticos.....	69
a. MacVector	69
b. UCSF Chimera	69
c. XLStat	70
d. Adobe Photoshop	70
IV. RESULTADOS	71
CAPÍTULO 1	
ESTRUCTURA DE NANOPARTÍCULAS DE TuMV OBTENIDA MEDIANTE CRIOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	73
INTRODUCCIÓN	75
RESULTADOS	77
1. Resolución de la estructura de TuMV	77
2. Interacciones entre subunidades	79
3. Interacción con ARN	82
4. Estructura de VLPs	83
DISCUSIÓN	85
CAPÍTULO 2	
IMPLICACIÓN DE LOS DOMINIOS FLEXIBLES DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE TuMV EN EL ENSAMBLADO DE NANOPARTÍCULAS	87
INTRODUCCIÓN	89
RESULTADOS	93

1. Localización de los dominios en la CP y en la estructura del virión de TuMV.....	93
2. Análisis de CPs de distintos potyvirus para el diseño de deleciones en TuMV.....	95
3. Mutantes en forma de VLPs	96
4. Mutantes en forma de virión.....	99
DISCUSIÓN	103

CAPÍTULO 3

MULTIFUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS VIRALES DE TuMV BASADA EN SU ESTRUCTURA 107

INTRODUCCIÓN.....	109
RESULTADOS	113
1. Estrategias de funcionalización basadas en la estructura de TuMV ...	113
2. Caracterización de las nanopartículas en distintos tampones y mantenimiento de la integridad a 37°C.	117
3. Derivatización de la región interna de la VNP por conjugación a cisteína.....	118
4. Derivatización de la superficie de las VNPs por conjugación a lisinas	122
5. Multifuncionalización.	125
DISCUSIÓN	127

CAPÍTULO 4

VNPs DE TuMV EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL..... 131

INTRODUCCIÓN.....	133
RESULTADOS	137
1. Producción y caracterización de VNPs de TuMV con el péptido Hsp60 301-320	137
2. Comparación de la sensibilidad de las VLPs en el reconocimiento de anticuerpos respecto del péptido libre y la proteína Hsp60 completa.....	138
3. Hsp60-VLPs para el diagnóstico de la inflamación intestinal.....	142
DISCUSIÓN	147

CAPÍTULO 5

NANOPARTÍCULAS DE TuMV FUNCIONALIZADAS CON PÉPTIDO ANTIMICROBIANO TAQUIPLESINA I..... 151

INTRODUCCIÓN.....	153
RESULTADOS	157
1. Fusión genética de Tpn I	157
2. Conjugación química de Tpn I en la superficie de VNPs	158
3. Formación de nanomallas funcionalizadas con Tpn I	160
DISCUSIÓN	163

V. DISCUSIÓN GENERAL 167

VI. CONCLUSIONES 173

VII. REFERENCIAS 177

RESUMEN

El empleo de virus en nanobiotecnología está cada vez más extendido, ya que su naturaleza proteica y su gran diversidad en forma, tamaño y origen los convierte en una buena herramienta biotecnológica. Dentro de este campo, los virus que únicamente infectan plantas cada vez toman mayor protagonismo debido a cuestiones de bioseguridad y producción, pudiendo emplearse en forma de nanopartículas virales, conocidas comúnmente como VNPs. Este tipo de nanopartículas consisten en una estructura proteica susceptible de derivatización, de manera que sus posibles aplicaciones son muy diversas, siendo las más desarrolladas las aplicadas al campo biomédico: herramientas hipersensibles para el diagnóstico, potentes agentes inmunizadores o soportes enzimáticos, entre otros. El *Virus del mosaico del nabo* (TuMV por sus siglas en inglés) es un potyvirus con una estructura alargada y flexuosa capaz de dar lugar a dos tipos de nanopartículas virales: viriones (virus infectivos modificados) y partículas "tipo virus" (VLPs, carentes de material genético y por tanto sin capacidad infectiva).

Objetivo:

Estudio estructural de TuMV para establecer las características diferenciales entre viriones y VLPs, así como a la determinación de las limitaciones y puntos clave para la funcionalización de VNPs. Esta funcionalización se ha realizado mediante estrategias de fusión genética y conjugación química, desarrollando nanopartículas con aplicaciones en diversos campos biotecnológicos.

Resultados:

Se ha obtenido la estructura de TuMV mediante criomicroscopía electrónica, así como la primera estructura de VLPs de un potyvirus, estableciendo nuevas e importantes características de estas nanopartículas.

Una vez resuelta esta nueva estructura, se ha realizado un estudio de las regiones suprimibles de la CP para futuras funcionalizaciones, ya sea por fusión genética o mediante conjugación química en la región interna del virión, en su superficie o mediante el desarrollo de nanomallas.

De estas aproximaciones biotecnológicas se han obtenido nanopartículas funcionalizadas con aplicaciones tanto en el campo biomédico y microbiológico.

Conclusión:

Los nuevos conocimientos relativos a la estructura del TuMV han permitido numerosos avances en la caracterización de nanopartículas derivadas de este virus, abriendo las puertas a desarrollos tecnológicos que implican tanto modificaciones genéticas como químicas, permitiendo diseños muy específicos de acuerdo a la aplicación buscada. El presente trabajo refleja el potencial que presentan estas nanopartículas, en las que pueden desarrollarse aplicaciones desde el campo biomédico al agrario, entre otros.

ABSTRACT

The use of viruses in nanobiotechnology is expanding. Due to their proteinaceous nature and variety in size, shape and origin they are a useful biotechnological tool. Within this field, viruses that only infect plants are becoming important due to issues of biosafety and production. Specifically, elongated viruses are a good platform for viral nanoparticles development, commonly known as VNPs. These nanoparticles present a derivatizable protein structure, and their applications are diverse: hypersensitive diagnostic tools, powerful immunizing agents or enzymatic supports, among others. *Turnip mosaic virus* (TuMV) is a potyvirus with an elongated and flexible structure, able to produce two types of viral nanoparticles: virions (modified infective viruses) and "virus-like" particles (VLPs, lacking genetic material, therefore infectivity).

Objective:

Structural study of TuMV to establish the differential characteristics between virions and VLPs, as well as the establishment of the limitations and key points for VNP functionalization. This functionalization has been carried out through strategies of genetic fusion and chemical conjugation, developing nanoparticles with applications in different biotechnological areas.

Results:

A TuMV structure has been obtained through cryo-electron microscopy, as well as the first potyvirus VLP structure, establishing the most relevant characteristics of these nanoparticles.

Once this new structure was solved, a study of CP suppressible regions has been carried out for future functionalizations, either by genetic fusion or by chemical conjugation in the virion internal region, on its surface, or by the development of nanonets.

Deploying these biotechnological approaches, functionalized nanoparticles with applications in the biomedical and microbiological field have been obtained.

Conclusion:

New knowledge related to the TuMV structure has allowed significant advances in the characterization of nanoparticles derived from TuMV, opening the doors to technological developments involving both genetic and chemical modifications, allowing very specific designs according to the application sought. The present work reflects the potential of these nanoparticles, where applications can be developed from biomedical to agricultural fields, among others.

I. INTRODUCCIÓN

1. Nanobiotecnología

La nanotecnología se ocupa de partículas o materiales con la característica de que al menos una de sus tres dimensiones debe ser de 100 nm como máximo (Britannica, 2018). Este ámbito científico-tecnológico ha experimentado un fuerte crecimiento como campo de investigación y desarrollo multidisciplinar, capaz de integrar ámbitos tan diversos como física, química, ingeniería, medicina y biología; buscando siempre un enfoque tecnológico. La convergencia de todos estos campos de investigación ha permitido el diseño y desarrollo de nanomateriales con características muy diferentes (dentro del intervalo comprendido entre 1 y 100 nm en cualquiera de las 3 dimensiones), difuminando los límites disciplinares y permitiendo el desarrollo de tecnologías mixtas con aplicaciones muy diversas (Soriano y col., 2018; Zhao y Zhang, 2007).

El desarrollo tecnológico que aúna tanto la nanotecnología como la biotecnología, dos campos de investigación y desarrollo en apogeo en el siglo XXI, da lugar a lo que se denomina "Nanobiotecnología". La nanobiotecnología integra principios y técnicas a nanoescala con sistemas biológicos. El interés científico en esta intersección de campos se basa en la percepción de que la nanotecnología ofrece nuevas herramientas biológicas, y que la biología ofrece acceso nanotecnológico a nuevos tipos de nanosistemas funcionales (Kim y col., 2008; Whitesides, 2003).

La nanobiotecnología está conduciendo a una nueva clase de materiales, dispositivos y sistemas multifuncionales para análisis biológicos y químicos con mejor sensibilidad y especificidad. La biología tiene mucho que ofrecer al mundo físico para demostrar cómo reconocer, organizar, funcionalizar y ensamblar nuevos materiales y herramientas para aplicaciones en múltiples campos como la energía, alimentación, cosmética, construcción o medicina, entre otros (Lowe, 2000; Simón-Vázquez y col., 2012).

Cabe destacar que dentro de la gran variedad de nanomateriales que se han desarrollado en las últimas décadas en forma de nanopartículas, nanotubos o nanocompuestos (Rawtani y col., 2018), hay que hacer una importante distinción entre nanomateriales naturales y sintéticos. Las nanopartículas de origen natural muestran una gran diversidad de características y aplicaciones: pueden emplearse como sistemas intracelulares o extracelulares, pueden estar formadas por materiales

orgánicos o inorgánicos y además tienen una amplia gama de funciones biológicas (King y col., 2018; Mangraviti y col., 2016; Stanley, 2014).

Concretamente, la biomedicina ha sabido sacar partido a estos sistemas nanoparticulados que permiten desarrollar herramientas para el diagnóstico, seguimiento de bioprocesos e incluso tratamiento de patologías gracias no solo a su alta sensibilidad y especificidad, sino también a la biodisponibilidad y biocompatibilidad (Haruyama, 2003; Tanaka y Chujo, 2014). Algunos materiales inorgánicos como la sílice y las nanopartículas de óxido de hierro han demostrado su potencial como sistema de administración de fármacos (Tang y col., 2012). Sin embargo, su toxicidad y difícil eliminación del cuerpo plantean importantes inconvenientes (Kang y Lim, 2012; Liu y col., 2011; Vallhov y col., 2007; Wang y col., 2007).

Por lo tanto, la búsqueda de materiales biocompatibles y biodegradables ha ganado interés en los últimos años. Actualmente están disponibles numerosos sistemas de nanopartículas con estas características, como nanopartículas poliméricas biodegradables de ácido poliláctico (PLA), liposomas o polímeros naturales como el quitosano. También las nanopartículas proteicas se muestran como una alternativa biocompatible muy útil debido a la capacidad de algunas de ellas de autoensamblarse en estructuras más complejas, además de otras características relacionadas con adhesión y reconocimiento, dando lugar a una ingeniería racional capaz de crear nuevos biomateriales para el desarrollo de vacunas, biocatálisis, administración de fármacos, por citar algunas de las posibles aplicaciones (Dordick y Lee, 2014; Howorka, 2011).

Por último, las nanopartículas virales (VNPs) (Hansen y Lehr, 2012) son nanomateriales naturales que en los últimos años han recibido atención por su tremendo potencial (Figura 1). Los virus son una alternativa biológica que ofrece numerosas ventajas frente a otros sistemas, concretamente en el campo biomédico. Ya se han empleado virus como plataforma en biomedicina para vehiculización de fármacos, terapia génica, vacunas, bioimagen y como herramientas para el diagnóstico (Chariou y col., 2016; Rohovie y col., 2017; Zdanowicz y Chroboczek, 2016).

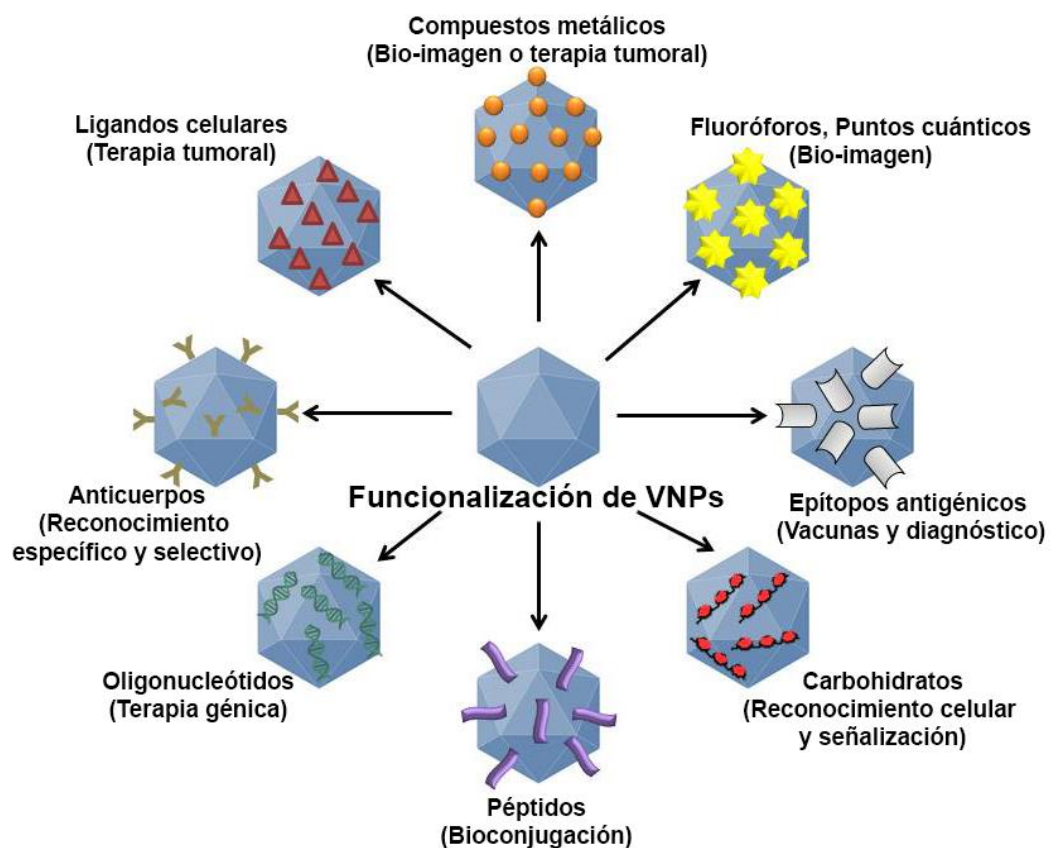


Figura 1. Funcionalización de nanopartículas virales en el campo biomédico. Distintos compuestos presentes en la cápsida viral y las posibles aplicaciones de las nanopartículas funcionalizadas [adaptado de (Narayanan y Han, 2017)].

En definitiva, la nanobioteconología está conduciendo a una nueva clase de dispositivos y sistemas multifuncionales para el análisis y procesos biológicos y químicos con mejor sensibilidad y especificidad. Además, los sistemas nanoparticulados de origen natural aportan ventajas extra de biocompatibilidad y bioseguridad, lo que los hace atractivos dentro de los campos de la biomedicina, la agricultura y la ganadería.

2. Virus como nanopartículas

A la hora de diseñar nanopartículas en campos como la biomedicina, existen ciertos factores a tener en cuenta, partiendo siempre de la capacidad de caracterizar el sistema. Es por ello que poder controlar el tamaño, estructura y características físicas de las nanopartículas es determinante a la hora de escoger un sistema u otro. Por otra parte, la capacidad de añadir nuevos grupos funcionales a los nanomateriales para

incluir distintos compuestos como marcadores fluorescentes, enzimas, péptidos o compuestos inorgánicos se muestra como una importante ventaja.

Por último, siempre es aconsejable tener en cuenta consideraciones respecto de la toxicidad y el impacto ambiental, así como los costes y la facilidad en la producción y purificación de las nanopartículas. Englobando todas estas consideraciones, las nanopartículas derivadas de virus (VNPs) se han posicionado como una alternativa biocompatible, eficiente y versátil dentro de la nanotecnología (Steele y col., 2017).

Las nanopartículas virales o VNPs son nanoestructuras consistentes en cientos hasta miles de moléculas proteicas denominadas proteínas de la cápsida (CP), que se autoensamblan para formar un andamio hueco que alberga los ácidos nucleicos (Ma y col., 2012). Se trata, por tanto, de nanopartículas de naturaleza proteica biocompatibles con sistemas vivos y biodegradables. Muchos de estos virus presentan también una envuelta lipídica similar a la membrana plasmática de células eucariotas, si bien es cierto que este tipo de envuelta es característica principalmente de virus animales, apareciendo únicamente en pocas especies de virus vegetales y fagos. Algunos de los más comúnmente empleados como nanopartículas se encuentran representados en la Figura 2.

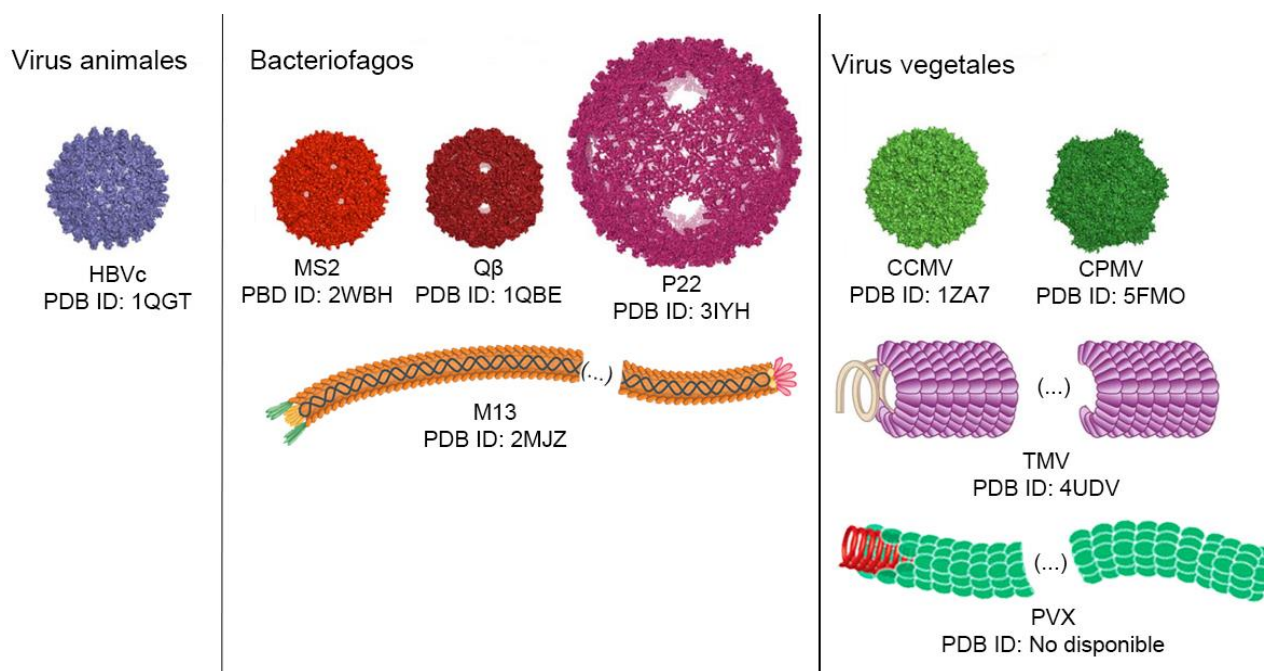


Figura 2. Virus más empleados como VNPs en nanobiotecnología. Se muestran los códigos PDB disponibles para evaluar la estructura de los mismos.

Existen diversos virus con diferente morfología, tamaño y naturaleza. De muchos de ellos en la actualidad se ha determinado tanto la secuencia genómica, como la de aminoácidos de las proteínas implicadas en la funcionalización. Además, en algunos de estos virus se ha podido determinar su estructura a nivel cristalográfico o por criomicroscopía electrónica, por lo que son sistemas muy estables y bien estudiados para el diseño de nanopartículas.

Estas nanopartículas pueden funcionalizarse por distintas vías, dependiendo de la aplicación que se busque. La más estudiada de las estrategias de funcionalización consiste en la modificación genética del virus, generando una proteína de fusión que codifica para la proteína de la cápsida con otros péptidos o proteínas fusionadas en localizaciones que no ocasionen impedimentos en el autoensamblado. Estos péptidos o proteínas fusionadas a la CP viral serían los que aporten funcionalidad (Johnson y col., 1997; Khudiyakov y Pumpens, 2015; Manchester y Steinmetz, 2009). Además, las proteínas de la cápsida presentan residuos aminoacídicos cuyas cadenas laterales son susceptibles de ser atacadas, permitiendo la conjugación química de compuestos de naturaleza muy diversa. Estos residuos son principalmente las cisteínas (por su grupo sulfhidrilo) y las lisinas (por su grupo amino), si bien es cierto que existen algunos otros residuos con características que permiten la funcionalización como la tirosina o el ácido glutámico (de Pinho Favaro y col., 2018; Tarhini y col., 2017).

Como alternativa al empleo de virus modificados o viriones como nanopartículas, existe otro tipo de VNP que aporta un extra de bioseguridad. Se trata de nanopartículas tipo virus o VLPs por sus siglas en inglés (Virus-like particles), que consisten en el armazón proteico de la cápsida viral sin ácidos nucleicos u otros componentes estructurales (ya sean proteicos o lipídicos). Son, por tanto, nanopartículas proteicas no infecciosas, producidas gracias a la capacidad de autoensamblado de las proteínas de la cápsida (Narayanan y Han, 2017; Pokorski y Steinmetz, 2011; Steinmetz, 2010; Yildiz y col., 2011). Una representación esquemática de una VLP del tipo icosaédrico aparece representada en la Figura 3.

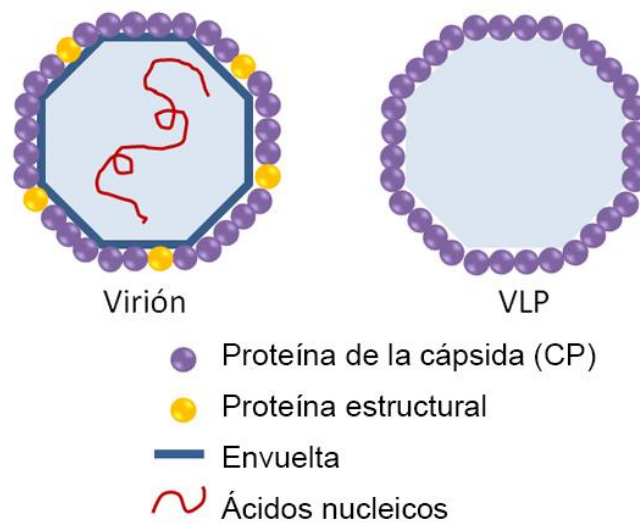


Figura 3. Diferencias entre VLPs y viriones.

Existen distintos sistemas de expresión para la producción de VLPs, como especies de levadura que incluyen *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*; bacterias, principalmente *Escherichia coli* (*E. coli*), el vector de expresión de baculovirus/células de insectos (BEVS/IC), varias líneas de células de mamíferos (Grgacic y Anderson, 2006) y plantas, como tabaco o lechuga (Kong y col., 2001; Mason y col., 1996).

Todas las características mencionadas y otras muchas convierten a los virus en una alternativa como biomaterial cada vez más empleada en nanobiotecnología.

3. Virus de plantas en nanobiotecnología

Dentro de los virus empleados como nanopartículas, los virus de plantas ofrecen diversas ventajas en el campo nanobiotecnológico.

La primera de las ventajas es la variabilidad. Entre los virus de plantas encontramos gran variabilidad de morfología, desde icosaédricos hasta tubulares e incluso flexuosos. Además, el abanico de tamaños oscila desde pocos nanómetros (como Germinivirus o Bromovirus) hasta más de dos micras de longitud (Closterovirus). Por último, también presentan variabilidad en cuanto a los ácidos nucleicos,

encontrando pocos géneros de virus de ADN y un mayor número de virus de ARN, tanto monocatenario como bicatenario (Lico y col., 2015; Steele y col., 2017; Wen y col., 2013).

Centrándonos en la simetría, en aplicaciones biotecnológicas los virus con una simetría helicoidal como los tobamovirus (principalmente el *Virus del mosaico del tabaco*, TMV) y potexvirus (principalmente el *Virus X de la patata*, PVX) proporcionan un alto número de subunidades de la proteína de la cápsida (CP) susceptibles de ser funcionalizadas. Aquellos con una arquitectura flexuosa y alargada, como PVX o el *Virus del mosaico de la papaya* (PapMV), también un potexvirus, son particularmente interesantes por su alto número de repeticiones de la CP por nanopartícula o un mejor rendimiento en la localización de tumores y la penetrabilidad en tejidos (Chariou y col., 2016; Lico y col., 2006; Shukla y col., 2013; Steinmetz y col., 2010).

La segunda ventaja de los virus de plantas es su simplicidad. La mayoría de estos virus carecen de envuelta y se componen de múltiples repeticiones de una o pocas proteínas estructurales que encapsidan los ácidos nucleicos formando un armazón robusto y muy estable.

También es un factor a tener en cuenta los amplios conocimientos que se han adquirido en el campo. Algunos de los virus más empleados en nanobiotecnología no solo están secuenciados, sino que su estructura atómica se conoce, o bien por cristalografía (sobre todo en virus icosaédricos), o por criomicroscopía electrónica, cada vez más empleada para determinar la estructura de virus con cierto nivel de flexibilidad. El conocimiento detallado de la estructura tridimensional de estos virus permite la identificación de regiones expuestas para la modificación de la CP sin interferir en el autoensamblado.

Otra de las ventajas a tener en cuenta es la bioseguridad que ofrecen respecto al resto de virus empleados como nanopartículas. Estos virus, al ser exclusivamente patógenos de plantas, no suponen un riesgo para la población, siendo innecesario el procesamiento posterior para la inactivación de la virulencia. Estas características junto a la biocompatibilidad y fácil metabolismo de las partículas virales convierten a las VNPs de plantas en buenas candidatas para su uso en biomedicina y farmacia (Dedeo y col., 2011; Geiger y col., 2013; Koch y col., 2015; Smith y col., 2006).

Por último, siendo una de las principales ventajas, nos encontramos con la alta productividad. La productividad en plantas es muy elevada, lo cual unido a

protocolos de purificación menos complejos que en los casos de virus animales o fagos nos permite productividades altas en cortos periodos de tiempo. Los sistemas de producción en plantas tienen muchas ventajas, motivo por el cual la denominada "Agricultura molecular" o "Plant Molecular Farming" se está convirtiendo en referente para la producción heteróloga de proteínas y otras moléculas. Las plataformas de producción en plantas no solo son rentables, altamente escalables y libres de patógenos de mamíferos así como de endotoxinas, sino que el plegamiento de proteínas, el ensamblado y las modificaciones postraduccionales también son muy similares a las producidas en células de mamíferos al tratarse de organismos eucariotas (Kushnir y col., 2012).

Además de la producción por transgénesis, se han desarrollado numerosos vectores basados en patógenos de plantas, como los vectores pEAQ (*plasmid Easy And Quick*), que permiten una alta producción en un corto periodo de tiempo (Sainsbury y col., 2009), siendo un sistema eficiente que puede ser aplicable a la producción de VLPs. Varias plataformas ya han adquirido este sistema de producción, como Medicago para la producción de compuestos biomédicos (D'Aoust y col., 2010) o Bioproducts en el control de plagas mediante sistemas sostenibles (Charudattan y Hiebert, 2007).

Todas estas características convierten a los virus de plantas en excelentes candidatos para su empleo como sistemas nanoparticulados.

4. Aplicaciones de VNPs de plantas en nanobiotecnología

Los virus en sí mismos se han empleado en biotecnología para el estudio del proceso infeccioso o gama de huésped mediante virus modificados genéticamente, o también empleando vectores virales para la producción de proteínas heterólogas (Bendahmane y col., 2002; Canizares y col., 2005; Gleba y col., 2007; Porta y col., 2003; Touriño y col., 2008; Voloudakis y col., 2005). Sin embargo, el empleo de los virus en nanobiotecnología ofrece otra gran variedad de aplicaciones. Desde esta perspectiva, las nanopartículas derivadas de virus de plantas, tanto con estructura icosaédrica como elongada, presentan numerosas aplicaciones en

nanobiotecnología, abarcando campos de investigación que van desde la ingeniería o la biomedicina.

Algunas de las aplicaciones en bioingeniería consisten en la formación de distintos biomateriales, aprovechando las características de los virus, estructuralmente ordenados y homogéneos. Algunos ejemplos son la formación de biopolímeros empleando los virus como molde, generando monocapas cuyas dimensiones se controlan gracias a las características intrínsecas de estos virus (Alonso y col., 2013; Rong y col., 2009; Royston y col., 2009).

Por otro lado, con este tipo de nanopartículas también se forman estructuras metálicas, que van desde capas metálicas hasta la formación de nanotubos. En este caso intervienen sobre todo los virus con estructura helicoidal, empleando distintos sistemas de afinidad por metales, como empleo de péptidos con gran afinidad por ciertos iones metálicos, o por adsorción (Kadri y col., 2011; Lee y col., 2005). Algunas de las aplicaciones de estos materiales son la formación de nanosistemas o de nanocables a través de los poros virales o de la superficie (Kadri y col., 2011; Love y Talianky, 2018; Royston y col., 2008). El empleo de estos sistemas permite no solo un control a nivel nano de la formación de capas, tubos o cables metálicos, sino que además ofrece ventajas medioambientales respecto a sistemas convencionales que emplean agentes reductores muy agresivos con el medio ambiente, mientras que las nanopartículas virales emplean sus propios residuos aminoacídicos para la síntesis. Además, la fusión genética de péptidos con afinidad por metales también ofrece aplicaciones de biorremediación, eliminando la contaminación por metales pesados de aguas o sustratos de distinta naturaleza (Mejía y Bülow, 2001).

Los virus de plantas también pueden utilizarse en distintos bioprocesos. Por ejemplo, ciertas partículas se emplean en procesos enzimáticos, inmovilizando enzimas en la superficie viral de virus helicoidales, formando nanomallas o en el interior de nanopartículas icosaédricas (Comellas-Aragones y col., 2007; Cuenca y col., 2016; Sánchez-Sánchez y col., 2014). Estas enzimas inmovilizadas pueden mejorar su actividad enzimática o, utilizando nanopartículas que permitan una liberación de la enzima en condiciones determinadas de pH, controlar el momento y lugar en que se desencadene su actividad.

Si bien es cierto que todas las aplicaciones anteriormente citadas ofrecen numerosas ventajas y se presentan como buenas opciones en nanobiotecnología, el mayor número de aplicaciones nanobiotecnológicas que se han desarrollado con

nanopartículas virales de plantas lo encontramos dentro del campo biomédico. Según este planteamiento, las nanopartículas virales aparecen como herramientas multifuncionales, permitiendo de manera simultánea su uso como agente terapéutico y diagnóstico, constituyendo uno de los denominados agentes “teranósticos”.

Las primeras aplicaciones desarrolladas con nanopartículas virales de plantas utilizaron la característica intrínseca de los virus de ser altamente inmunogénicos. De esta forma, la presentación en virus de plantas de antígenos propios de otras infecciones animales y/o humanas, consigue un mayor poder de inmunización, siendo la vacunación una de las posibles aplicaciones (Canizares y col., 2005; Cardenas-Vargas y col., 2016; Grill y col., 2005; McCormick y col., 2006; Therien y col., 2017). Este alto poder inmunogénico, unido al hecho de que los virus de plantas no constituyen en ningún caso un riesgo para la salud pública al no ser capaces de infectar huéspedes humanos ni animales, hacen que sea una alternativa con un mayor nivel de bioseguridad. Es cierto que, ya que presentan un alto nivel de inmunogenicidad, esta alternativa solo sería útil en una vacunación, ya que en caso de volver a administrar las nanopartículas al mismo individuo, la memoria inmune lo atacaría con gran rapidez y no daría tiempo a desencadenar una nueva respuesta inmune. Sin embargo, el gran potencial de estas nanopartículas ha hecho que cada vez se investiguen nuevos sistemas de camuflaje que permitan una vida media más prolongada del sistema (Lee y col., 2017; Pitek y col., 2016).

Es gracias a estos sistemas de camuflaje que las nanopartículas virales también se muestran como herramienta para la administración de fármacos, ya sea por introducirlos dentro de la cavidad de virus icosaédricos o por conjugarlos por distintas reacciones químicas a los residuos aminoacídicos de las proteínas virales (Bruckman y col., 2016; Geng y col., 2007; Le y col., 2017a; Lee y col., 2016a; Lico y col., 2015; Ma y col., 2012; Zdanowicz y Chroboczek, 2016). Al tratarse de sistemas proteicos que además ofrecen la posibilidad de incluir señales o ligandos, e incluso liberación controlada por pH o temperatura, constituyen una alternativa biosegura carente de problemas de citotoxicidad como los que presentan las nanopartículas metálicas (Benelli, 2016; Blandino y col., 2015; Capek, 2015; Ma y col., 2012; Wang y col., 2016; Zdanowicz y Chroboczek, 2016).

Además del potencial en el tratamiento de distintas patologías, las nanopartículas virales también se presentan como una buena herramienta diagnóstica. Esto se debe a que, en muchas ocasiones, ya sea porque los niveles de anticuerpos en sangre asociados a una patología concreta son muy bajos o porque el

antígeno implicado presenta limitaciones en el diagnóstico, la presentación multimérica en la superficie viral se presenta como una posible solución. Esto es lo que ocurre, por ejemplo, cuando el antígeno en cuestión es un péptido de pequeño tamaño, o cuando dentro de una proteína completa el epítipo inmunodominante se encuentra poco accesible para inmunoensayos tipo ELISA. De esta forma, la presentación de estos péptidos en la superficie viral mediante proteínas de fusión ofrece una presentación multimérica del péptido en una única partícula, aumentando de forma considerable la sensibilidad del sistema (González-Gamboa y col., 2017; Sánchez y col., 2013).

Otra de las opciones que se están desarrollando dentro del campo del diagnóstico es el diagnóstico por imagen, en el que las nanopartículas virales aparecen como alternativa al portar elementos de contraste o fluoróforos (Alemzadeh y col., 2018; Lewis y col., 2006; Steinmetz, 2010; Yildiz y col., 2011), lo que unido a la capacidad de dirigirlos mediante ligandos o señales concretas permitiría una localización concreta y un uso menor de compuestos potencialmente dañinos para el organismo.

Con todos estos ejemplos se muestra cómo las nanopartículas virales vegetales ofrecen multitud de alternativas en biotecnología, apareciendo opciones novedosas cada año, siendo una tecnología en constante desarrollo.

5. Potyvirus

La familia *Potyviridae* contiene diez géneros de virus, cuyos ácidos nucleicos son de ARN de cadena sencilla y sentido positivo. Esta familia contiene más de 200 especies, 168 de las cuales pertenecen al género *Potyvirus* (Wylie y col., 2017).

El género *Potyvirus* es el segundo género más amplio de virus que infectan plantas (tras los *Begomovirus*, con 200 especies), causando grandes pérdidas en numerosos cultivos. Estos virus se transmiten por pulgones de forma no persistente, y algunos de ellos también se pueden transmitir por semillas. Las plantas infectadas, especialmente los huéspedes naturales, desarrollan síntomas tales como lesiones cloróticas locales, mosaico, moteado o rugosidad.

El genoma de estos virus contiene un marco de lectura abierto (ORF) que codifica para una gran poliproteína, la cual se procesa proteolíticamente por proteasas codificadas por el propio virus. Además, el ARN se encuentra flanqueado por dos regiones no codificantes. En 5', concretamente en el nucleótido 1, la región no codificante se encuentra covalentemente unida a la proteína VPg del virus, en 3' la región no codificante finaliza con una cola de poliadenilato con longitud variable (Brunt, 1992; Shukla y Ward, 1988; Shukla y col., 1994; Urcuqui-Inchima y col., 2001).

Las proteínas que codifica este ORF son: La proteína 1 (P1), la proteinasa componente asistente de la transmisión y supresor del silenciamiento génico (Helper Component Proteinase, HCPro), la proteína 3 (P3), la proteína de 6 kDa número uno (6K1), la proteína de inclusiones citoplásmicas (CI), la proteína de 6 kDa número 2 (6K2), proteínas de inclusiones nucleares a y b (NIa y NIb), proteína unida al genoma (VPg) y proteína de la cápsida (CP). Aparte de este gran ORF, aparecen tres marcos secundarios más pequeños que codifican para las proteínas P3-N-PISPO (en muy pocos miembros de la familia), P3-N-PIPO y P3-N-ALT.

El genoma del virus, las proteínas para las que codifica y sus presuntas funciones se resumen en la Figura 4.

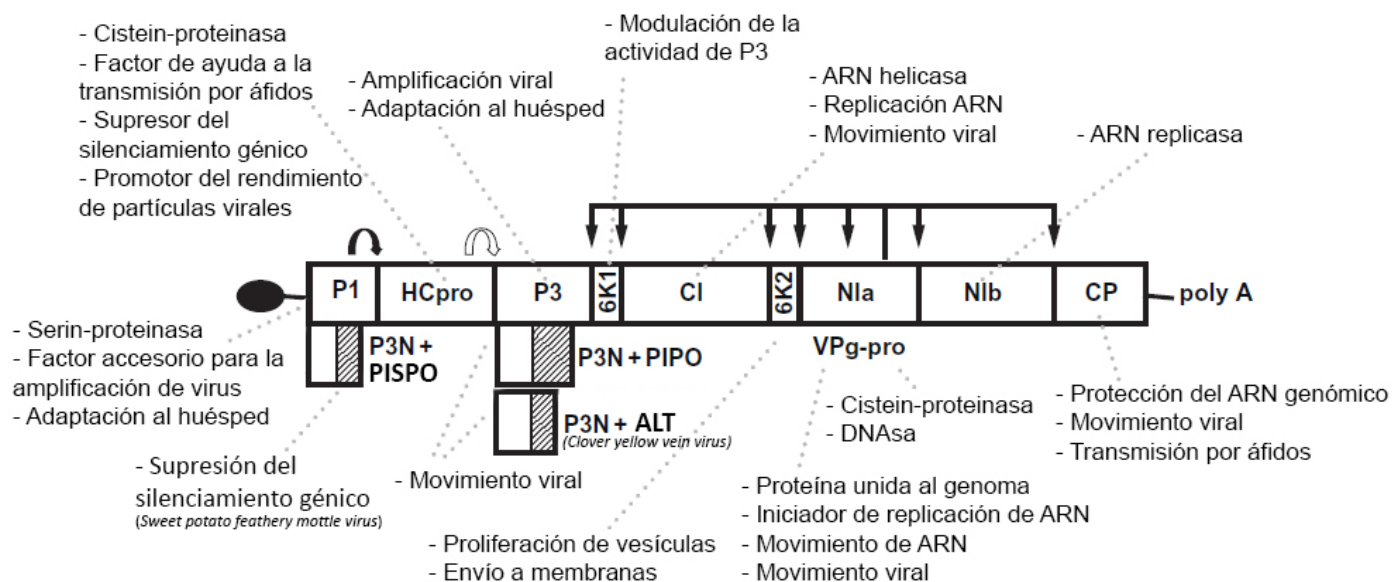


Figura 4. Características relevantes y funciones propuestas de las proteínas de potyvirus. El marco de lectura abierto largo se representa como una caja dividida en productos finales por líneas negras. Los marcos de PISPO, PIPO y ALT se indican como un área rayada debajo de la región P1 o P3. La proteína terminal (VPg) se representa como una elipse negra. Las flechas que comienzan en las tres proteasas (P1, HCPro y NIa) situadas encima de la caja indican los sitios de escisión en la poliproteína. Las funciones identificadas para cada proteína se dan al final de las líneas punteadas a partir de cada proteína.

Para la funcionalización de nanopartículas virales se emplea la proteína de la cápsida (Cardenas-Vargas y col., 2016; González-Gamboa y col., 2017; Hema y col., 2008; Kalnciema y col., 2012; Sánchez y col., 2013; Touriño y col., 2008), cuya función principal es la encapsidación del genoma viral. Cada virión contiene aproximadamente 2000 copias de la CP, dispuestas helicoidalmente en torno al genoma viral, generando nanopartículas alargadas y flexuosas de entre 11 y 13 nm de diámetro y entre 680 y 900 nm de longitud.

En lo referente a la estructura de los potyvirus, si bien es cierto que la flexibilidad de las partículas impide su cristalización, otros estudios estructurales en diversos potyvirus o virus con morfología similar han permitido determinar que el virión consta de 8,8 subunidades de la CP por vuelta con una inclinación de unos 35 Å (Agirrezabala y col., 2015; Baratova y col., 2001; Gutiérrez y col., 2011; Kang y col., 2006; Kendall y col., 2008; McDonald y col., 2010; Shukla y col., 1989; Stubbs y col., 2008; Zamora y col., 2017). La estructura de la proteína de la cápsida consta de un núcleo central o "core" muy conservado en los distintos potyvirus, del cual parten los dominios amino y carboxilo terminales, N-terminal y C-terminal respectivamente. La región N-terminal se encuentra expuesta en la superficie del virus, y es la región más variable entre los distintos miembros del género; mientras que la región C-terminal recientemente se ha localizado en la zona interna del virión, formando un andamio interno.

En el presente trabajo, el virus que ha sido objeto de estudio es el *Virus del mosaico del nabo* (TuMV por las siglas en inglés de *Turnip mosaic virus*). Las características estructurales típicas de los potyvirus lo convierten en un candidato adecuado para la funcionalización mediante distintas vías, algunas de las cuales han sido desarrolladas con éxito en trabajos previos.

Existen dos vías principales de funcionalización de nanopartículas virales de TuMV, y ambas son aplicables tanto a viriones como a VLPs.

5.1. Funcionalización de viriones de TuMV por fusión genética.

El hecho de que la región N-terminal de la proteína de la cápsida viral se encuentre expuesto en la superficie del virión hace que la generación de proteínas de fusión en esta localización sea posible, si los péptidos fusionados no ocasionan

impedimentos que afecten a la infectividad del virus (Cruz-Fernández, 2011; González-Gamboa, 2011; González-Gamboa y col., 2017; Ibort, 2011; Sánchez y col., 2013).

Sin embargo, existen varios factores a tener en cuenta a la hora de seleccionar los péptidos que se fusionarían en el extremo N-terminal, de forma que no afecten ni a la infectividad ni al ensamblado del virus. Estos factores son la carga neta del péptido, la hidrofobicidad, la estructura secundaria, la longitud del péptido a fusionar y la presencia de cisteínas que puedan dar lugar a puentes disulfuro entre sí o con la CP (Barcena y Blanco, 2013; Li y col., 2007).

Una vez escogidos los péptidos teniendo en cuenta estas consideraciones, la fusión genética tiene lugar gracias al plásmido infeccioso p35-Tunos-Vec01-NAT1 del aislado UK1 de TuMV (Tourinho y col., 2008), empleando distintas dianas para enzimas de restricción presentes de forma natural en el genoma del virus para el intercambio de fragmentos génicos.

En el caso particular de la fusión genética al N-terminal de la CP, se emplean las dianas *Mlu* I (presente en el dominio C-terminal de la proteína NIb) y *Nae* I (inmediatamente tras el primer aminoácido de la CP), de forma que se mantengan las dianas para el procesamiento proteolítico posterior. Para modificaciones en otros dominios de la CP o en otras proteínas del virus se emplean otras dianas.

Los pasos a seguir se describen brevemente en la Figura 5.

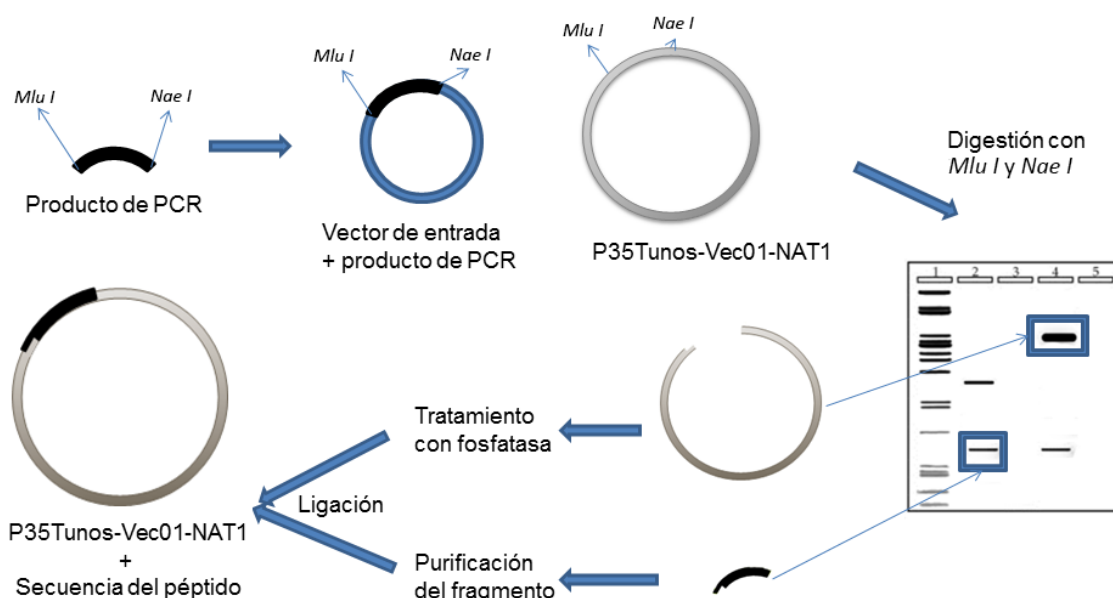


Figura 5. Representación esquemática de la producción de viriones de TuMV mediante el vector infeccioso p35Tunos-Vec01-NAT1.

5.2. Funcionalización de VLPs de TuMV por fusión genética.

Ya sea porque se requieran nanopartículas no infecciosas por cuestiones de bioseguridad o necesidad de una completa ausencia de ácidos nucleicos (González-Gamboa y col., 2017) o porque algún péptido, aun cumpliendo con las especificaciones pertinentes, impida la infección sistémica de plantas huésped de TuMV, como alternativa a los viriones se encuentran las VLPs. En el caso de TuMV, las VLPs se producen gracias al empleo de vectores pEAQ basados en el sistema de infección de *Agrobacterium tumefaciens*, incluyendo como parte del genoma un casete de expresión donde se inserta la secuencia de la CP como un marco abierto de lectura, añadiendo no solo la secuencia del péptido correspondiente, sino también la metionina inicial y el codón STOP al final de la secuencia génica de la CP.

El esquema de la producción de VLPs de TuMV se presenta en la Figura 6.

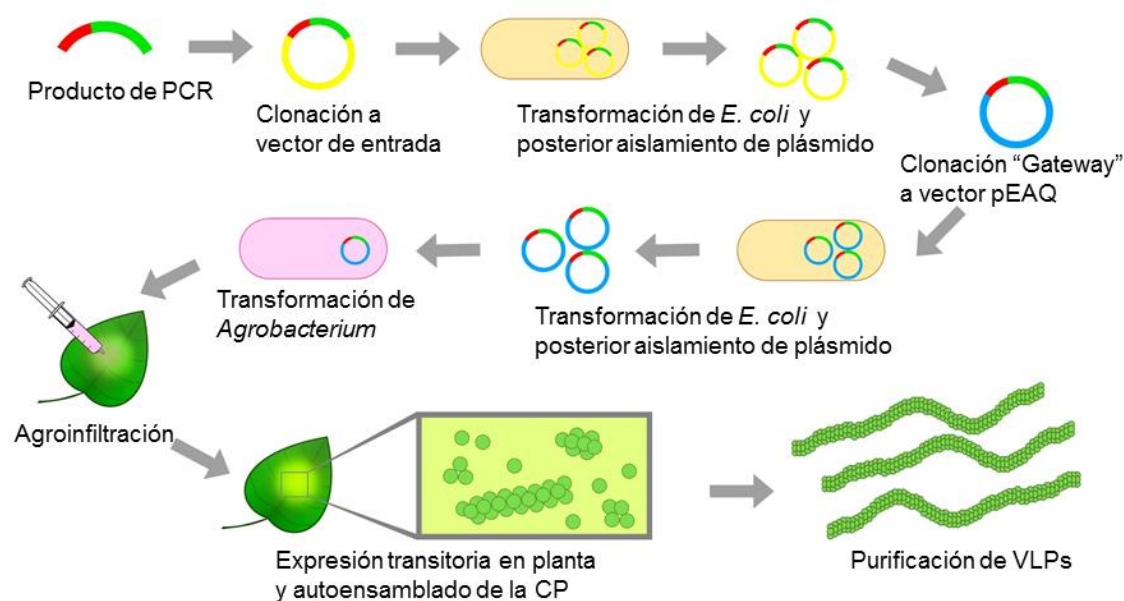


Figura 6. Representación esquemática de la producción de VLPs de TuMV mediante el sistema de expresión pEAQ.

Este sistema de expresión permite que mediante agroinfiltración tenga lugar una expresión transitoria de la CP modificada, que gracias a su capacidad de autoensamblado dará lugar a VLPs.

En cualquier caso, ya sea por fusión genética en virión o en VLPs, como resultado obtendremos nanopartículas virales funcionalizadas con aproximadamente 2000 copias del péptido seleccionado.

5.3. Funcionalización de VNP's por conjugación química.

Al tratarse de compuestos proteicos, la posible presencia de aminoácidos con cadenas laterales altamente reactivas en posiciones expuestas en la superficie del virión es una alternativa no solo para fusión de proteínas o péptidos inviables para la fusión genética, sino también para la conjugación de compuestos de distinta naturaleza química y para la funcionalización simultánea en varias localizaciones del virus con diferentes moléculas, dando lugar a partículas multifuncionales.

Los residuos más comúnmente empleados con este fin en otros virus suelen ser cisteínas (por su cadena lateral con un grupo sulfhidrilo) y lisinas (con aminos primarias en su cadena lateral), aunque cada vez se abre más el abanico de aminoácidos con los que se logra una conjugación exitosa.

El proceso de conjugación tiene lugar ya sea de forma directa (el compuesto a conjugar presenta un grupo que directamente es capaz de atacar el residuo formando enlaces estables) o indirecta mediante conectores. Estos conectores son bifuncionales, presentando en cada extremo un grupo capaz de formar enlaces. Los conectores pueden ser homo- o heterobifuncionales en función de si estos dos grupos son iguales o diferentes, respectivamente. Además, hay ciertas reacciones que requieren de dos conectores: uno para la nanopartícula y otro para el compuesto a conjugar. El proceso de conjugación se muestra esquemáticamente en la Figura 7.

Si bien es cierto que esta estrategia de derivatización abre las puertas a diferentes compuestos químicos, no limitando la funcionalización únicamente a compuestos de naturaleza proteica como en la fusión genética, siguen existiendo limitaciones en cuanto a los impedimentos estéricos que pueden aparecer. Además, mientras que en la fusión genética existe un control total en cuanto al número de copias por CP (siempre será uno), en conjugación química hay una mayor variabilidad, y el proceso de conjugación debe optimizarse para cada caso empleando distintas relaciones molares, impidiendo la aplicación de un sistema estándar en todos ellos.

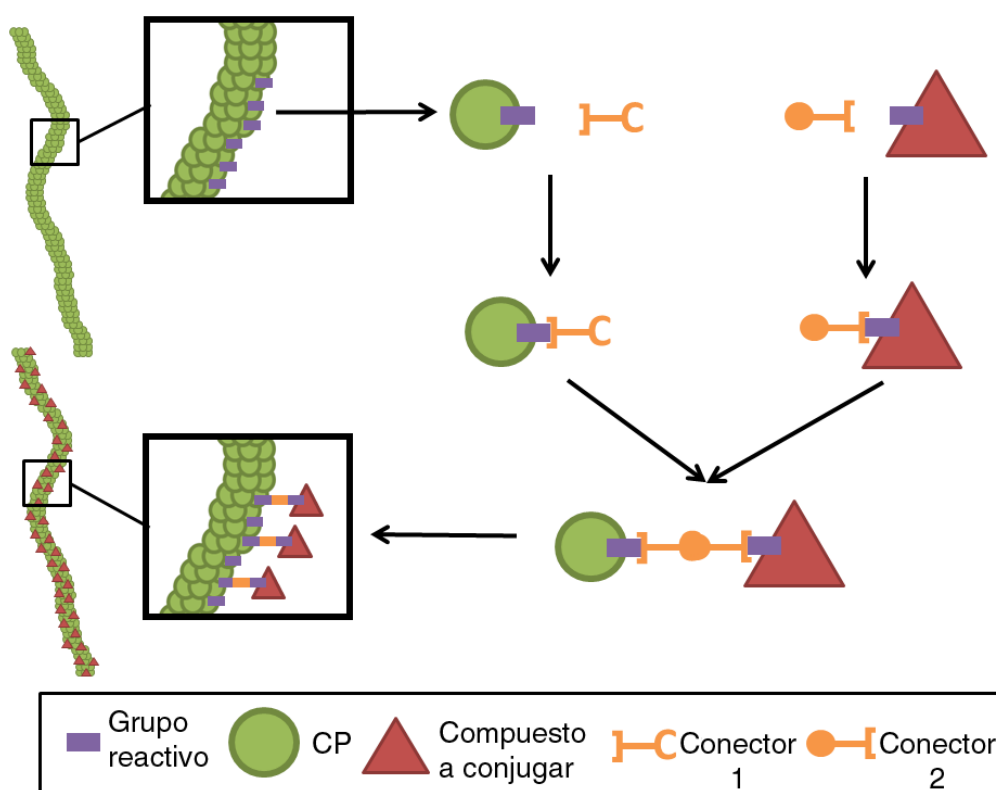


Figura 7. Representación esquemática de la conjugación química en VNPs mediante dos conectores heterobifuncionales.

En definitiva, el trabajo realizado a lo largo de esta Tesis Doctoral está enfocado en el estudio del *Virus del mosaico del nabo*, buscando una caracterización en profundidad para desarrollar distintos abordajes de funcionalización de nanopartículas virales dependiendo de la aplicación que se desea alcanzar.

II. OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es la funcionalización de nanopartículas virales derivadas del *Virus del mosaico del nabo* con aplicaciones biotecnológicas. Más concretamente, los objetivos propuestos para este trabajo son los siguientes:

1. Caracterización estructural de TuMV, resolviendo su estructura atómica mediante criomicroscopía electrónica.
2. Caracterización estructural de eVLPs de TuMV, las primeras nanopartículas de este tipo estructuradas en un potyvirus.
3. En base a la estructura obtenida, determinar las hipotéticas regiones de la proteína de la cápsida susceptibles de ser eliminadas sin afectar al ensamblado y/o infección de nanopartículas virales, con la finalidad de aumentar la capacidad de fusión genética de VNPs de TuMV.
4. Establecer nuevas estrategias de funcionalización mediante conjugación química a distintos residuos aminoacídicos, de nuevo en base a su localización y accesibilidad en la estructura de TuMV.
5. Conjuguar químicamente compuestos de distinto tamaño y naturaleza química en distintas localizaciones del virión.
6. Obtener nanopartículas de TuMV funcionalizadas con péptidos para el diagnóstico hipersensible de patologías autoinmunes.
7. Obtener nanopartículas de TuMV funcionalizadas con péptidos con actividad antimicrobiana con fin de mejorar la biodisponibilidad y estabilidad de estos péptidos mediante presentación multimérica.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material biológico

a. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas empleadas para las transformaciones requeridas en este trabajo fueron *Escherichia coli* DH5a y *Agrobacterium tumefaciens* LAB4404. Los detalles de su genotipo se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas bacterianas.

Nombre	Características	Fuente
<i>Escherichia coli</i> DH5a	F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-, mK+) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1	Thermofisher®
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	Ach5 pTiAch5 Sm/Sp® en el plásmido de virulencia (de Tn904)	(Hoekema y col., 1983)
<i>Dickeya dadantii</i> 3937	Cepa de tipo silvestre aislada de las plantas de <i>Saintpaulia ionantha</i>	(Glasner y col., 2011)
<i>Sarcina lutea</i>	Cepa tipo silvestre cedida por la UPM	
<i>Pseudomonas auruginosa</i> PAO1	Mutante espontáneo resistente al cloranfenicol de la cepa PAO original aislada de una lesión	(Klockgether y col., 2010)

b. Virus

Para los ensayos realizados a lo largo de esta tesis se ha trabajado con el *Virus del mosaico del nabo* (TuMV por sus siglas en inglés), más concretamente el aislado UK1 (Tomlinson y Ward, 1978).

c. Plantas

Para la infección viral se emplearon ejemplares de *Nicotiana benthamiana* L. para la propagación del virus y su posterior empleo como inóculo en *Brassica juncea* (mostaza india) para la producción a gran escala, ambos huéspedes sistémicos del virus.

En el caso de la agroinfiltración se empleó únicamente *N. benthamiana* para la producción a gran escala.

El cultivo de las plantas se realizó en invernadero con condiciones controladas de luz (16 horas de luz), humedad (45-60%) y temperatura (entre 18-24°C).

d. Modelos animales

Los ratones utilizados en estos estudios fueron tratados de acuerdo a la Directiva 2010/63/UE sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos, a fin de garantizar su bienestar.

Se empleó el modelo inducido por dextrano sulfato de sodio (DSS), un polímero sulfatado con capacidad citotóxica sobre las células epiteliales intestinales y los macrófagos. Además, el DSS enteral favorece el aumento de bacterias anaeróbicas *Gram* negativas, lo que junto con el potencial erosivo sobre la barrera intestinal y la inapropiada respuesta de los macrófagos propiciaría la aparición de lesiones intestinales (Mañé Almero, 2007). Este modelo reproduce las características clínicas, histopatológicas e inmunes que se observan en humanos de manera que induce colitis crónica asociada con diarrea y pérdida de peso.

El compuesto químico se administró en el agua de bebida a una concentración del 1,35% (p/v) y el progreso de la enfermedad se determinó mediante el seguimiento del peso de los ratones y el número de granulocitos en sangre periférica (seguimiento realizado por el personal del CIEMAT).

La presencia de autoanticuerpos se determinó en sueros de ratones obtenidos en distintos momentos desde la inducción de la enfermedad mediante sangrados de la cola o del ojo. Todos los ensayos fueron del tipo "simple ciego".

e. Anticuerpos

Todos los anticuerpos citados se emplearon para diversos ensayos: ELISA indirecto, inmunodetección de proteínas hibridadas en membrana (WB) e inmunodecoración en microscopía electrónica (ISEM).

Tabla 2. Anticuerpos.

Anticuerpo	Especie huésped	Dilución ELISA	Dilución WB	Proveedor
Anti-poty	Ratón	1:300	1:1000	Agdia
Anti-TuMV	Conejo	1:500	1:1000	Agdia
Anti-Hsp60 D307	Conejo	1:1000	1:2000	Cell Signal

Anti-Hsp60 Policlonal	Ratón	1:500	1:1000	Abcam
Anti-VIP	Conejo	1:500	1:2000	GeneTex
Anti-biotina	Conejo	1:100	1:500	ThermoFisher
Anti-VEGFR3	Conejo	1:100	1:500	Abcam
Anti-Ratón AP	Cabra	1:30 000	1:50 000	Merck
Anti-Conejo AP	Cabra	1:30 000	1:50 000	Sigma

f. Enzimas de restricción

Para la digestión de ADN plasmídico se emplearon diversas enzimas, que quedan recogidas en la Tabla 3.

Tabla 3. Enzimas de restricción.

Enzima de restricción	Tª de digestión	Tiempo de digestión	Tª de inactivación	Tiempo de inactivación	Proveedor
Acc I	37°C	1 h	80°C	20 min	NEB
BspH I	37°C	1 h	80°C	20 min	NEB
Mlu I-HF®	37°C	1 h	-	-	NEB
Nae I	37°C	1 h	-	-	NEB
Pst I	37°C	1 h	65°C	15 min	Promega
Sal I-HF®	37°C	1 h	65°C	15 min	NEB

NEB: New England Biolabs

g. Proteínas y péptidos

Se utilizaron distintas proteínas y péptidos como controles en diversos ensayos, así como para la funcionalización de nanopartículas. La información referente a todos ellos se encuentra en la Tabla 4.

Tabla 4. Proteínas y péptidos.

Proteína/Péptido	Proveedor
BSA	Merck
Hsp60 recombinante humana	Enzo
Péptido de Hsp60 301-320	Biomatiks
Péptido VIP	PolyPeptide Group
Péptido VIP con ácido azido pentanoico	Caslo
Péptido Tpn I con ácido azido pentanoico	Caslo

h. Conectores y compuestos químicos para conjugación química

Para la funcionalización de VNPs por conjugación química se emplearon varios conectores, todos ellos suministrados por ThermoFisher.

Tabla 5. Conectores y compuestos para conjugación química.

Compuesto	Afinidad por grupo
I-AEDANS	Sulfhidrilo
Iodoacetil-PEG ₂ -biotina	Sulfhidrilo
Sulfo-SIAB	Sulfhidrilo y aminas primarias
NHS-Alexa fluor 555	Aminas primarias
NHS-Fosfina	Aminas primarias y azida
NHS-PEG ₄ -Azida	Aminas primarias y fosfina
Alexa fluor 488 Azida	Fosfina
Glutaraldehido	Aminas primarias

2. Mantenimiento de los microorganismos

a. Medios de cultivo

A continuación, se describe la composición de distintos medios de cultivo microbiológico, tanto para el crecimiento de microorganismos como para otros procesos como la elaboración de células competentes o el fomentar la actividad de ciertas cepas. Salvo que se indique lo contrario, el pH de los medios no se ajustará, ya que la composición descrita debería dejar el medio en un rango adecuado.

Medio Luria-Bertani (LB): Para el mantenimiento y propagación de las cepas bacterianas *E. coli*, *A. tumefaciens* y *P. auriginosa*. El medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos, y una vez atemperado a unos 50°C se añadieron los antibióticos de selección, previamente esterilizados por filtración (0,22 µm).

Tabla 6. Composición del medio LB.

Componente	g/L
Triptona	10
NaCl	10
Extracto de levadura	5

En el caso de que dicho medio se empleara para la preparación de placas de medio sólido, a la composición se añadió agar a una concentración de 15 g/L antes de autoclavar. Inmediatamente después añadir el/los antibióticos se distribuyó el medio en las placas Petri desechables, conservándolas a 4°C hasta su utilización y durante no más de dos meses.

Para *E. coli*, dependiendo del plásmido con el que se transformaba la cepa (ver sección 4a Plásmidos), se añadieron como antibióticos de selección ampicilina a una concentración de 100 µg/mL o kanamicina a una concentración de 50 µg/mL.

En cualquier caso, para el cultivo de las cepas de *A. tumefaciens*, además del antibiótico al cual el plásmido confiere resistencia, siempre incluirán rifampicina en el medio selectivo por ser la cepa resistente a este antibiótico, a una concentración de 50 µg/mL.

Medio Fi broth: Para la preparación de células competentes de *E. coli*.

Tabla 7. Composición del medio Fi broth.

Componente	Composición
Bacto triptona	2%
Extracto de levadura	0,5%
KCl	10 mM
MgSO ₄	0,4%

Nota: Ajustar pH a 7,6 con KOH.

Medio Tfb1: Para la preparación de células competentes de *E. coli*.

Tabla 8. Composición del medio Tfb1.

Componente	Composición
RbCl	100 mM
MnCl ₂ ·4H ₂ O	50 mM
CH ₃ CO ₂ K	30 mM
CaCl ₂	10 mM
Glicerol	15%

Nota: Ajustar a pH 5,8 con ácido acético. Esterilizar por filtración (0,22 µm). Almacenar a 4°C.

Medio Tfb2: Para la preparación de células competentes de *E. coli*.

Tabla 9. Composición del medio Tfb2.

Componente	Composición
RbCl	10 mM
CaCl ₂	75 mM
MOPS pH 7,0	10 mM
Glicerol	15%

Medio MMA: Para la agroinfiltración de plantas.

Tabla 10. Composición del medio MMA.

Componente	mM
MES pH 5,6	10
MgCl ₂	10
Acetosiringona	0,6

Tanto el MES como el MgCl₂ se prepararon con anterioridad a una concentración de 100 mM y 1M respectivamente, se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos y se conservaron a 4°C hasta la preparación del medio MMA. La acetosiringona se preparó a una concentración de 100 mM, disuelta en etanol al 70% (v/v) y conservada a -20°C hasta su utilización.

Medio universal: para el crecimiento y conservación de *S. lutea* (Tabla 11).

Tabla 11. Composición del medio universal.

Componente	g/L
Glucosa	5
Extracto de levadura	5
Bacto triptona	5
Extracto de carne	5
K ₂ HPO ₄	2

En el caso de que dicho medio se empleara para la preparación de placas de medio sólido, a la composición se añadió agar a una concentración de 15 g/L antes de autoclavar. Una vez atemperado el medio, se distribuyó en las placas Petri

desechables, conservándolas a 4°C hasta su utilización y durante no más de dos meses.

Medio mínimo M9: para los ensayos de antibiogramas (Tabla 12).

Tabla 12. Composición del medio mínimo M9.

Componente	mM
Na ₂ HPO ₄	48
KH ₂ PO ₄	22
NaCl	9
NH ₄ Cl	19
MgSO ₄	2
CaCl ₂	0,1
Glucosa	20

El medio se prepara con todos los componentes excepto la glucosa para autoclavar. Una vez esterilizado, se añade una solución de glucosa al 20% p/v, previamente esterilizada por filtración (0,22 µm), hasta alcanzar la concentración deseada. En el caso de que dicho medio se empleara para la preparación de placas de medio sólido, a la composición se añadió agar a una concentración de 15 g/L antes de autoclavar. Una vez atemperado el medio, se distribuyó en las placas Petri desechables, conservándolas a 4°C hasta su utilización y durante no más de dos meses.

Medio N1: para el crecimiento y conservación de *D. dadantii* (Tabla 13).

Tabla 13. Composición del medio N1.

Componente	g/L
Extracto de levadura	2
Bacto triptona	5
Extracto de carne	1
NaCl	5

En el caso de que dicho medio se empleara para la preparación de placas de medio sólido, a la composición se añadió agar a una concentración de 15 g/L antes de autoclavar. Una vez atemperado el medio, se distribuyó en las placas Petri desechables, conservándolas a 4°C hasta su utilización y durante no más de dos meses.

b. Condiciones de crecimiento

Todas las cepas se cultivaron durante la noche u *overnight* (o/n) en LB suplementado con antibióticos con oxigenación y agitación, la cual variaba dependiendo de la cepa. Las cepas de *E. coli* con resistencia adquirida tienen distintas temperaturas de crecimiento por características específicas de los plásmidos (Tabla 14).

Tabla 14. Condiciones de crecimiento bacteriano.

Nombre	Resistencia antibióticos empleada para la selección	Temperatura (°C)	Agitación (RPM)
<i>E. coli</i> DH5a	Km	37	180
<i>E. coli</i> DH5a	Amp	30	150
<i>A. tumefaciens</i> LBA4404	Rif + Km	28	180
<i>D. dadantii</i>	-	37	180
<i>P. aeruginosa</i>	-	37	180
<i>S. lutea</i>	-	37	180

Nota: Para cultivo en medio sólido, las temperaturas de crecimiento fueron las mismas.

Para cultivos con volúmenes inferiores a 50 mL, se empleó como inóculo un aislado en placa. Para cultivos con volúmenes superiores a 50 mL, se preparó un precultivo con las características del anterior. Se empleó un 10% (v/v) de este precultivo para hacer el cultivo de gran volumen. Siempre se emplearon matraces con un volumen, como mínimo, 3 veces superior al del cultivo.

c. Condiciones de almacenamiento

A corto plazo (1-3 meses), las cepas transformadas con las diferentes construcciones se conservaron a 4°C en placas de LB suplementadas con el antibiótico requerido. Para la conservación a largo plazo, se prepararon 5 mL de cultivos o/n. Al día siguiente se añadió a 1 mL de esos cultivos glicerol 80% (v/v) hasta alcanzar una concentración final del 20% (v/v). Estos cultivos con glicerol se prepararon por duplicado y, tras congelarlos en nitrógeno líquido, se almacenaron uno a -20°C y otro a -80°C.

3. Preparación de células competentes y transformación de cepas

a. Preparación de *E. coli* DH5a

Las células se prepararon siguiendo un protocolo descrito previamente (Sambrook y col., 1989). Se comenzó preparando un preinóculo de 10-15 mL de cultivo en medio Fi broth (Tabla 7) inoculando a partir de colonias aisladas de una placa fresca (células estriadas en placa el día anterior). Se creció el cultivo a 37°C con agitación hasta una DO_{550} de 0,3. A continuación se inocularon 100 mL de Fi broth precalentado a 37°C con 5 mL del preinóculo y se creció con agitación hasta DO_{550} de 0,48. Una vez alcanzada la DO deseada, se enfriaron las células rápidamente en hielo, se pasaron a tubos de centrifuga de 250 mL y se centrifugaron a 7500 x g 7 minutos a 4°C.

Una vez centrifugado el cultivo, se descartó el sobrenadante, asegurándose de eliminar todo el medio de cultivo. Se resuspendió el sedimento en 30 mL de medio Tfb1 (Tabla 8) y se centrifugó en las mismas condiciones que anteriormente.

Se descartó el sobrenadante y resuspendió cuidadosamente el sedimento en 4 mL de medio Tfb2 (Tabla 9). Se prepararon alícuotas de 200 µL y se congelaron a -80°C.

b. Preparación de *A. tumefaciens* LBA4404

Se prepararon siguiendo un protocolo previamente descrito (An, 1987). Se comenzó preparando un preinóculo en 10 mL de LB (atemperado), dejándolo un día a 28°C, con agitación. Al día siguiente se inocularon 100 mL de LB (atemperado suplementado con rifampicina) con 4 mL de preinóculo y se dejó crecer con agitación hasta una DO_{600} de 0,5-1,0. En este punto las células han alcanzado la fase de crecimiento exponencial. A partir de ese momento, se hizo todo en hielo.

Una vez se obtuvo la DO deseada, se centrifugó 5 minutos a 4000 x g, a 4°C. Se descartó el sobrenadante y a continuación se resuspendió el sedimento cuidadosamente en 20 mL de NaCl 15 mM frío y estéril.

A continuación, se centrifugó 5 minutos a 4000 x g, a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 2 mL de CaCl₂ 20 mM frío, filtrado (0,22 µm) y autoclavado (20 minutos, 121°C).

Para finalizar, se hicieron alícuotas de 100 µL, que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y conservaron a -80 °C.

c. Transformación de *E. coli*

Se comenzó descongelando una alícuota de células competentes a temperatura ambiente y dejándola 5 minutos en hielo. Transcurrido ese tiempo, se añadieron entre 300 y 1000 ng de ADN plasmídico al vial de células (nunca un volumen superior a ¼ del volumen de la suspensión de células) y se dejaron 30 minutos en hielo. A continuación, se dio un choque térmico de 30 segundos a 42°C. Finalmente, se añadieron 300 µL de medio LB (Tabla 6) y se incubó durante 90 minutos a 37°C.

Cuando finalizó el protocolo de transformación, se emplearon dos placas de medio selectivo. En una de las placas se sembraron 50 µL de la transformación y en la otra el resto, tras centrifugarlo durante 3 minutos a 3 000 rpm y quitar el exceso de medio. Las placas se dejaron incubando o/n a 37°C o dos días a 30°C dependiendo del plásmido con el que se transformaron.

d. Transformación de *A. tumefaciens*

Para la transformación de *Agrobacterium* se añadieron 2 µg de ADN a una alícuota de competentes sin descongelar depositada en hielo. A continuación, se incubó en un baño a 37°C durante 5 minutos, mezclando el vial cada minuto. Una vez transcurrido este tiempo, se dejó la transformación 30 minutos en hielo y después se añadieron 600 µL de LB (Tabla 6) y se incubó a 28°C durante 3 horas. Se centrifugó a 3000 rpm para eliminar el exceso de medio y finalmente se plaqueó la transformación en una placa de medio suplementado con antibióticos, que se incubó durante 2-3 días a 28°C.

4. Técnicas de Biología Molecular y ADN recombinante

a. Plásmidos

pENTR™/D-TOPO® (ThermoFisher): vector activado por la Topoisomerasa I del virus *Vaccinia* para la clonación direccional de productos de PCR con extremo romo y secuencia CACC en 5'. Una vez clonado en este sistema se puede pasar a vectores de expresión mediante sistema Gateway®. Para la selección de transformantes consta de resistencia a kanamicina, flanqueada por dianas para la enzima de restricción Bsp HI (Figura 8).

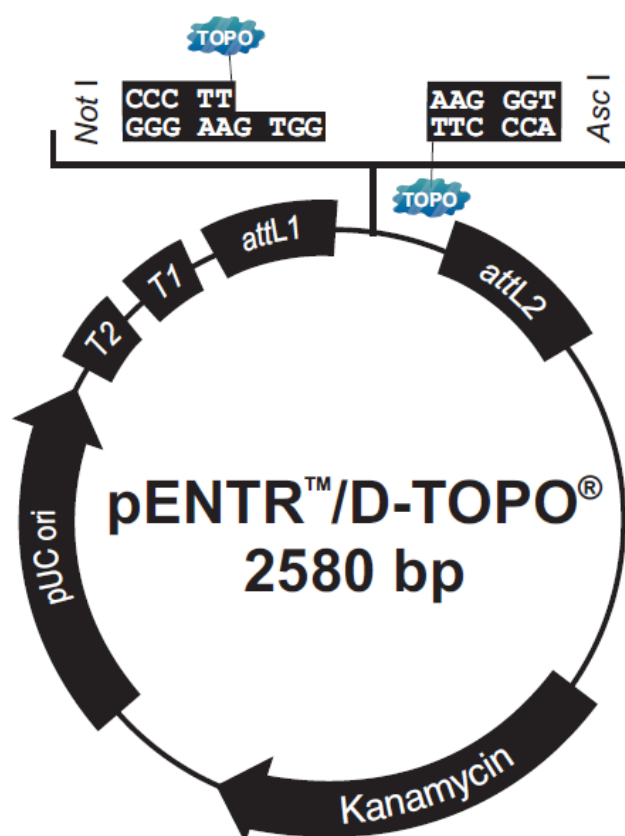


Figura 8. Mapa de pENTR™/D-TOPO®. En él se muestra la secuencia GTGG para la clonación direccional donde se inserta el producto de PCR, flanqueado por las dianas de restricción Not I y Asc I, los terminadores T1 y T2, el origen de replicación pUC, las secuencias para la clonación Gateway attL1 y attL2 y el gen de resistencia a kanamicina.

pCR™-Blunt II-TOPO® (ThermoFisher): vector linealizado y activado por Topoisomerasa I para la clonación de productos de PCR con extremo romo. Para la clonación desde otros vectores el plásmido consta de un MCS (siglas en inglés de sitio múltiple de clonación, "multiple cloning site") con numerosas dianas de restricción para facilitar el intercambio de insertos. Para la selección de transformantes consta de resistencia a kanamicina y zeocina (Figura 9).

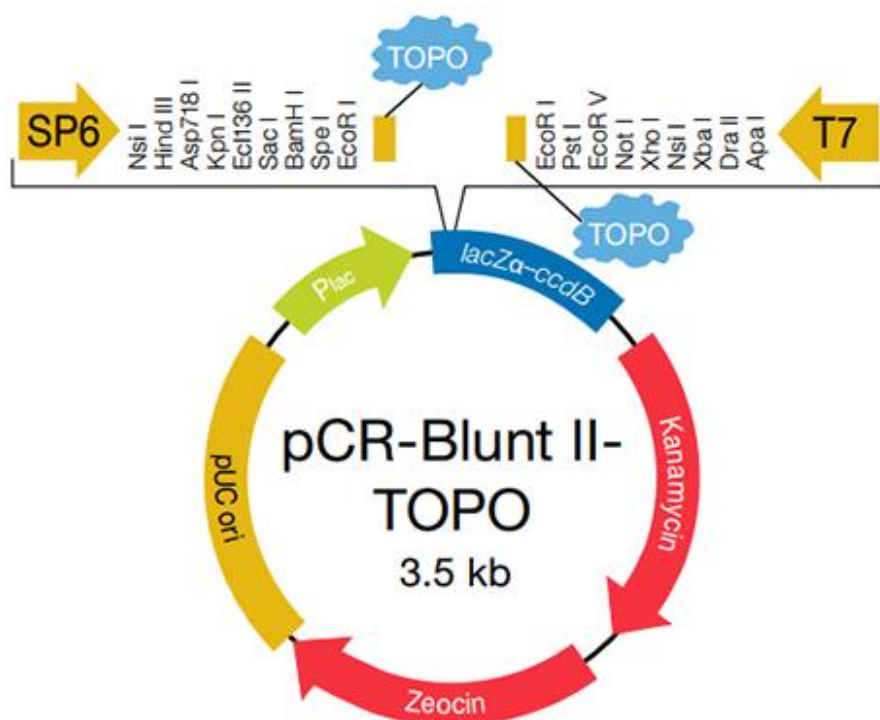


Figura 9. Mapa de pCR™-Blunt II-TOPO®. Se muestra la región activada por la topoisomerasa I donde se inserta el producto de PCR, el MCS y la posición en la que anillan los cebadores SP6 y T7. También se muestra el origen de replicación pUC, el promotor Plac, y el gen de fusión deletéreo lacZα-ccdB, que permite la selección de transformantes. Además, se muestran los genes de resistencia a antibióticos kanamicina y zeocina™.

pEAQ-HT-DEST1: generosamente suministrado por el Profesor George Lomonossoff, vector de expresión basado en el plásmido Ti de *A. tumefaciens*, que permite la expresión de proteínas recombinantes en tejido de planta agroinfiltrada. La clonación se produce gracias al sistema Gateway® desde pENTR™/D-TOPO®.

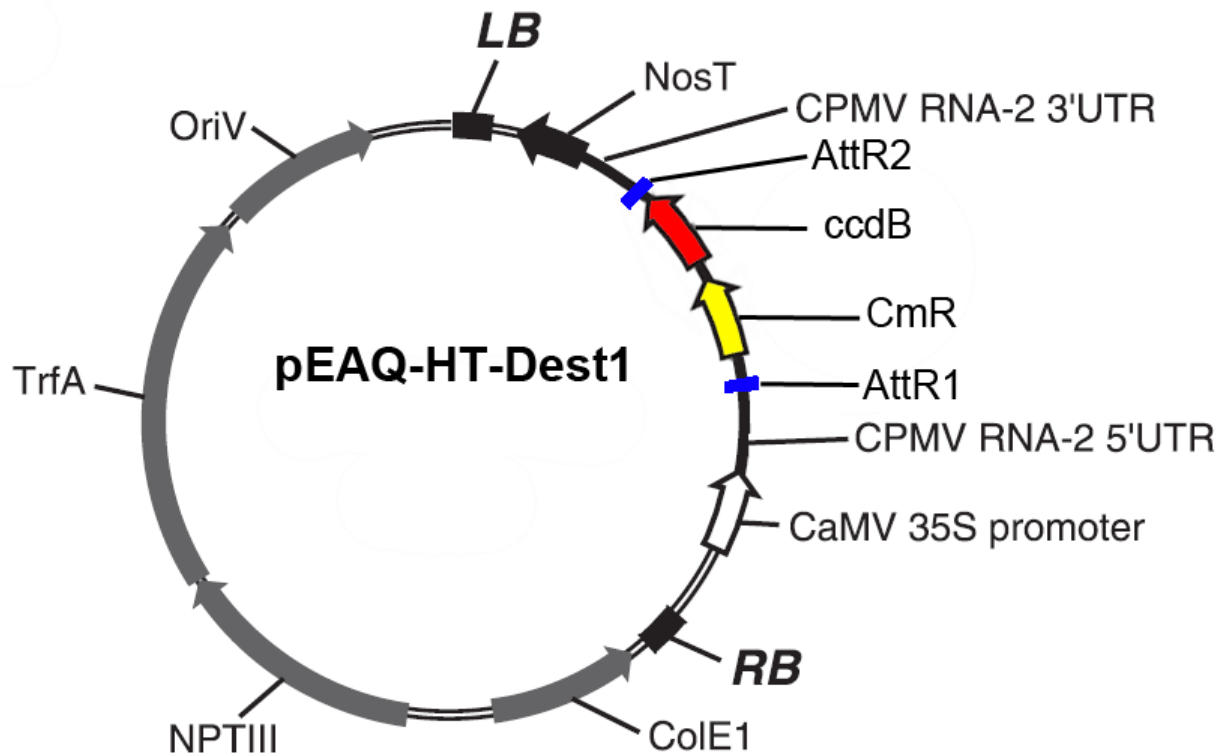


Figura 10. Mapa de pEAQ-HT-Dest1. La región implicada en la recombinación Gateway es la comprendida entre las regiones UTR. En amarillo se muestra el gen de resistencia a cloranfenicol (CmR), en rojo el gen de control de proliferación celular (ccdB), ambos flanqueados por regiones attR (azul), que serán las que recombinen con las regiones AttL en el vector pENTR/D-TOPO.

p35Tunos-Vec01-NAT1: vector desarrollado en nuestro grupo de investigación, que consiste en un clon infectivo de TuMV bajo el control del promotor 35S del *Virus del mosaico de la coliflor* y el terminador del gen *nos* (Sánchez y col., 1998), no transmisible por áfidos (Tourinho y col., 2008), que codifica para la poliproteína de TuMV, que tras ser procesada por proteasas dará lugar a las distintas proteínas del virus.

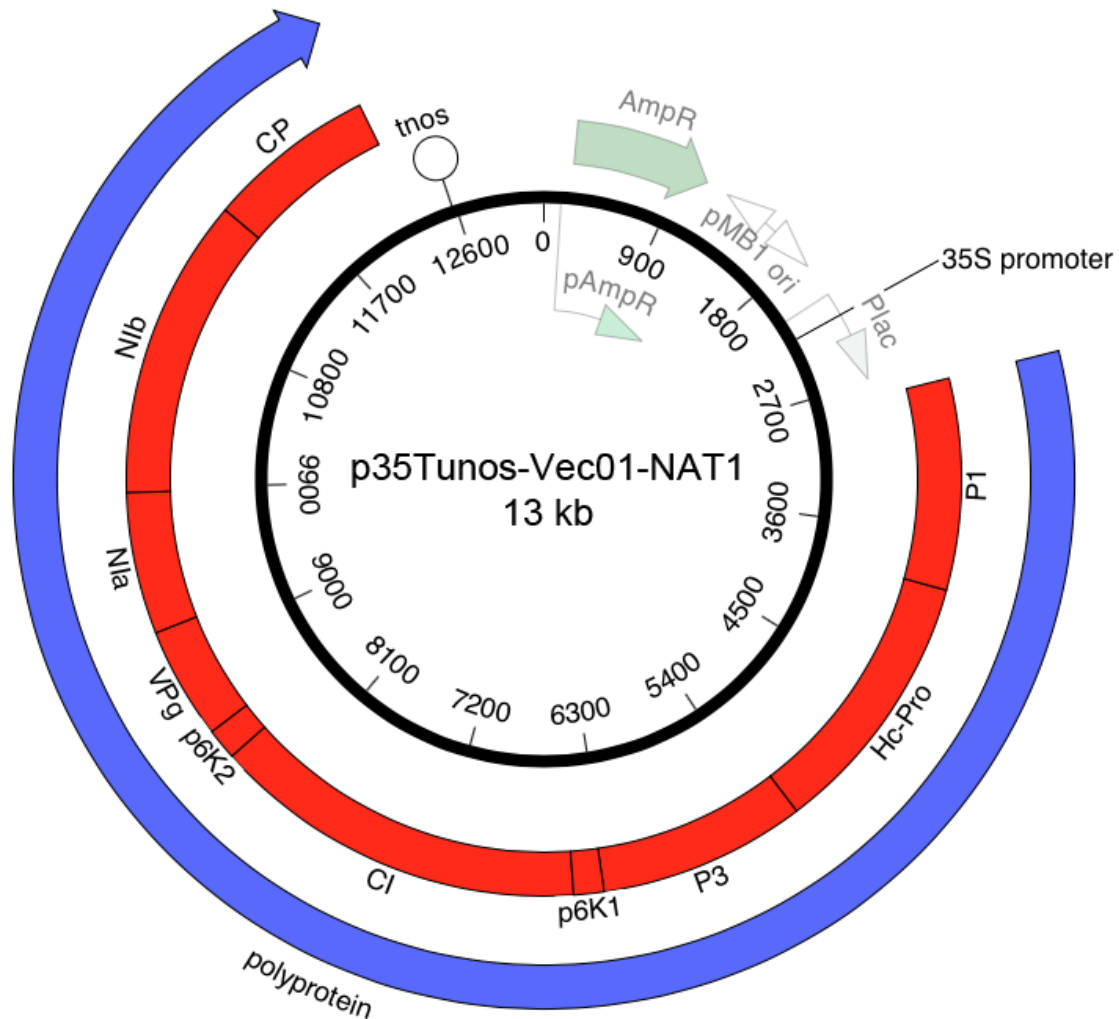


Figura 11. Mapa del vector p35Tunos-Vec01-NAT1. Se muestran tanto el promotor 35S como el terminador nos, además del marco de lectura que codifica para la poliproteína del virus y el gen de resistencia a ampicilina.

b. Cebadores

Todos los cebadores se diseñaron gracias al software MacVector y fueron suministrados por ThermoFisher.

Tabla 15. Cebadores.

Cebador	Secuencia 5' → 3'
CP-VLP-Fw	CACCATGGCCGGCGAAAC
CP-VLP-Rv	CTCGAGTCACAACCCCTGAACG
ΔN27	CACCATGGCCGGCAAGGAAC
ΔN54	CACCATGGCCGGCGTAAAC
ΔN81	CACCATGGCCGGCAAAAG
ΔN108	CACCATGGCCGGCAAGC
ΔC215	CTCGAGTCACATGTCGGTTAAATTGCGCTGAA
ΔC246	CTCGAGTCATGCTGCTGCTTTCATCTGGAT
ΔC272	CTCGAGTCACGTATGCCTCTCCGTGTTCTC
195	CAAGCAATCTTTGAGGATTATG
196	TATTTCCCATAGCGAGAATAC
319	CAGAGTTTCCCGTGG
320	TCACCAAACATAGAAATGC
336	GGTCTGGTCCATTGAGAACGGAAC
T7p	TAATACGACTCACTATAGGG
M13-Fw(-20)	GTAAAACGACGGCCAGT

c. Clonación en pENTR/D-TOPO®

Para la clonación direccional de productos de PCR o genes sintéticos con la secuencia CACC en 5' se preparó la mezcla de clonación, que consiste en 4 µL de producto de PCR, 1 µL de solución salina [1,2 M NaCl, 60 mM MgCl₂] y 1 µL del plásmido pENTR/D-TOPO®, siguiendo las instrucciones del proveedor. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después la reacción de clonación puede almacenarse a -20°C o utilizarse inmediatamente para transformar células de *E. coli* competentes.

Una vez realizada la transformación de células competentes y sembradas en medio con resistencia a kanamicina, se dejaron crecer. Con la aparición de clones se prepararon cultivos con 10 colonias para realizar extracciones de ADN plasmídico.

d. Clonación en PCR-Blunt II-TOPO®

La clonación en el vector PCR-Blunt II-TOPO® sigue el mismo protocolo descrito para pENTR/D-TOPO®.

e. Clonación en pEAQ-HT-Dest1

La clonación en pEAQ-HT-Dest1 se realizó a partir de plásmidos pENTR/D-TOPO®. Ya que ambos vectores presentan el gen de resistencia a kanamicina para la selección de transformantes, el primer paso fue escindir este gen de pENTR/D-TOPO®. En este vector, el gen de resistencia se encuentra flanqueado por dianas de restricción de BspHI, de manera que se realizó una digestión de ADN siguiendo las indicaciones especificadas en la Tabla 3. Una vez digerida la muestra, se analizó en un gel de agarosa del 0,8% (p/v).

Una vez comprobada la total digestión del plásmido, se preparó la reacción de recombinación homóloga Gateway®, empleando el kit enzimático Gateway® LR Clonase® II. Para ello, se mezclaron (en un total de reacción de 8 µL) 300 ng de vector pENTR/D-TOPO con 300ng de vector pEAQ-HT-DEST1, añadiendo tampón TE [Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0] hasta alcanzar el volumen final. A esta mezcla se le añadieron 2 µL de LR clonasa comercial y se incubó o/n a temperatura ambiente en oscuridad.

Al día siguiente y para detener la reacción se añadió 1 µL de proteinasa K (incluida en el kit) y se incubó a 37°C durante 10 minutos.

Se empleó la mitad de esta reacción para la transformación de células competentes de *E. coli*. Una vez realizada la transformación de células competentes y sembradas en medio con resistencia a kanamicina, se dejaron crecer y con la aparición de colonias se prepararon cultivos con 10 de ellas para realizar extracciones de ADN plasmídico.

f. Clonación en p35Tunos-Vec01-NAT1

Para la clonación en este plásmido se partió de clonaciones en PCR-Blunt II-TOPO. Los plásmidos confirmados se digirieron con unas enzimas de restricción determinadas para la posterior ligación en p35Tunos-Vec01-NAT1. La mitad de esta reacción de ligación se empleó para la transformación de células competentes de *E. coli*. Una vez transformadas, se sembraron en placas suplementadas con ampicilina y se cultivaron durante 2 días a 30°C. De las colonias resultantes, treinta se analizaron por PCR de colonias, y las que presentaban el tamaño deseado se cultivaron en medio líquido para realizar extracción de ADN plasmídico y posterior secuenciación.

g. Extracción de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico de cultivos bacterianos a pequeña escala se empleó el QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del proveedor. El proceso de extracción consiste en una lisis alcalina de las células, seguida de la precipitación de ADN genómico y aislamiento del ADN plasmídico gracias a su unión a una resina y posterior elución del ADN de la misma.

Las purificaciones de ADN plasmídico se visualizaron en gel de agarosa para confirmar el correcto tamaño del vector, y posteriormente se realizó la secuenciación de los mismos para confirmar la correcta secuencia.

h. Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN se realizó mediante espectrofotometría en el espectrofotómetro Nanodrop™. Se calculó la concentración a partir de la absorbancia a 260 nm, considerando que una unidad de absorbancia a esta longitud de onda equivale a 50 ng/μL para ADN de doble hélice o 20 ng/μL para ADN de hélice sencilla. También se empleó el parámetro de absorbancia a 280 nm para determinar la pureza de los ácidos nucleicos gracias a la relación A_{260}/A_{280} , siendo el óptimo para ADN entre 1,8 y 2,0.

Para la cuantificación de fragmentos pequeños de ADN procedentes de digestión de plásmidos, se emplearon geles de agarosa del 1,5% (p/v) con patrones de concentración conocida (Figura 12).

i. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Se realizó electroforesis en geles de agarosa para la visualización de plásmidos, amplicones de PCR y digestiones de ADN, así como para la extracción de fragmentos para su posterior purificación. Como patrones de tamaño se utilizaron el Fago Lambda digerido con Pst I y un marcador de 100 pares de bases (New England Biolabs®), con intervalo 100-1517 (Figura 12).

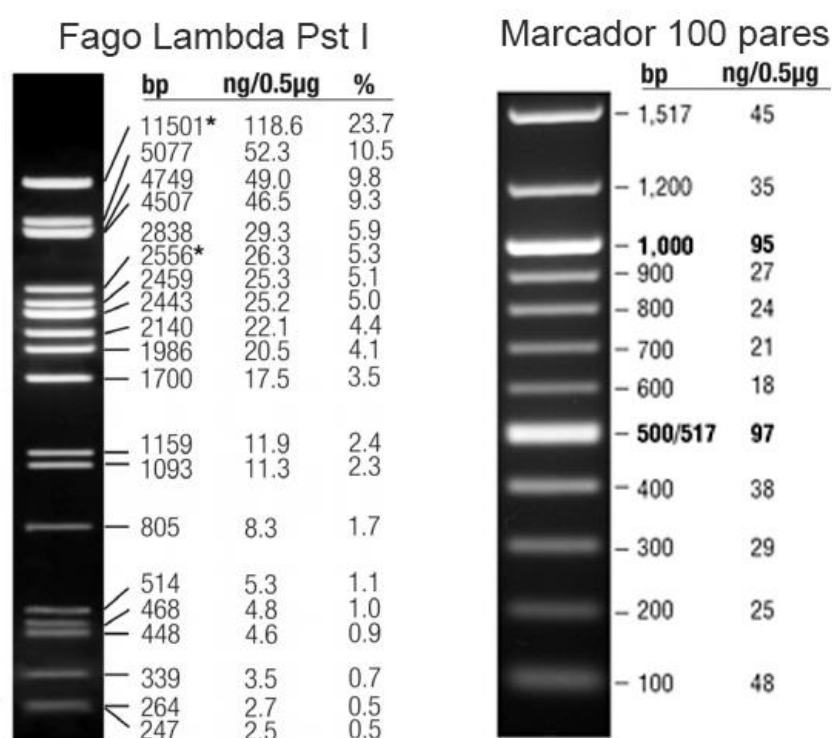


Figura 12. Marcadores de ADN para electroforesis en geles de agarosa.

Todas las electroforesis se realizaron en tampón TBE [Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3], y utilizando un tampón de carga [Ficoll 400 30% (v/v), EDTA 40 mM, xilencianol 0,2% p/v, azul de bromofenol 0,2% p/v] a un voltaje de 7 V/cm. Por norma general se cargaron 200 ng de ADN plasmídico (digerido o sin digerir), 5 µL de reacción de PCR y el volumen de digestión total en caso de purificación de fragmentos.

El porcentaje de agarosa empleado para el gel dependería del tamaño de ADN que se desea visualizar, utilizando principalmente 3 porcentajes: 0,5% (p/v) para plásmidos de más de 8 kb, 0,8% (p/v) para plásmidos de menos de 8 kb y 1,5% (p/v) para productos de PCR y digestiones.

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se sumergió en una solución con el agente intercalante bromuro de etidio (EtBr) para la posterior visualización de las bandas bajo luz UV mediante un transiluminador GelDoc (BioRad).

j. Electroforesis de ADN en gel de poliacrilamida

Se realizaron electroforesis de ADN en gel de poliacrilamida cuando se deseaba la purificación de fragmentos muy próximos entre sí en tamaño, ya que esta electroforesis ofrece mejor resolución de fragmentos pequeños.

El porcentaje p/v de poliacrilamida empleado dependería del intervalo de separación deseado.

Tabla 16. Porcentaje de poliacrilamida en electroforesis de ADN.

Porcentaje de poliacrilamida	Rango de separación
3,5	100-1000
5,0	80-500
8,0	60-400
12,0	40-200
20,0	10-100

Se prepararon 15 mL de solución para la preparación del gel con la composición descrita en la Tabla 17.

Tabla 17. Composición de geles de poliacrilamida para electroforesis de ADN.

Componente	Volumen
Agua destilada	Hasta alcanzar los 15 mL
Poliacrilamida 30% p/v	Dependiendo del porcentaje final
TBE10X	1,5 mL
PSA 10% p/v	100 µL
TEMED	4,5 µL

Al igual que en los geles de agarosa, la electroforesis se realizó en TBE a un voltaje de 7 V/cm. Las bandas se visualizaron añadiendo una solución de azul de metileno. Las bandas de agarosa se machacaron en una solución de acetato amónico 0,5 M y EDTA 1 mM y se incubaron o/n a 37°C.

k. Amplificación de ADN

Para la amplificación de ADN para la obtención de los fragmentos a clonar en los distintos vectores se empleó el procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa, comúnmente conocido como PCR por sus siglas en inglés. Para ello se realizaron reacciones de 50 μL , cuya composición se describe en la Tabla 18.

Tabla 18. Composición de la reacción de PCR.

Componente	Concentración
H ₂ O Mili-Q	-
Tampón de PCR 10X	1X
MgCl ₂	2 mM
Cebador 3'	125 μM
Cebador 5'	125 μM
dNTPs	125 μM
Pfu ADN polimerasa	0,02 U/ μL
Molde ADN	0,1 ng/ μL

Tampón de PCR 10X sin MgCl₂ (Biotools)

MgCl₂ 50 mM (Biotools)

Cebadores 100 mM (ThermoFisher)

dNTPs (LifeTechnologies) cada uno a una concentración de 100 mM

Pfu ADN polimerasa (Biotools) polimerasa de alta fidelidad, procedente de *Pyrococcus furiosus*, clonada en *E. coli*.

Para el programa de PCR, las temperaturas y ciclos que se emplearon se describen en la Tabla 19.

Tabla 19. Programa de PCR.

Proceso	Temperatura (°C)	Duración	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	45 seg	1
Desnaturalización	94	20 seg	35
Anillamiento	*	30 seg	
Extensión	72	2 min	
Extensión final	72	10 min	1
Enfriamiento	4	Hasta que se alcance la temperatura	

Nota: La temperatura de anillamiento (*) se encuentra entre 50 y 55°C, y está condicionada por las temperaturas de fusión de las parejas de cebadores implicadas en la reacción.

En algunos casos, en lugar de realizar una PCR, se diseñaron genes sintéticos GeneArt Strings (ThermoFisher), que se envían por el proveedor como producto de PCR.

l. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Para la digestión de ADN con enzimas de restricción se empleó un total de 5 µg de ADN en un volumen final de entre 25 y 50 µL. Para la digestión se emplearon las enzimas y condiciones reflejadas en la Tabla 3, y los tampones recomendados por el proveedor para cada caso. En caso de realizar digestiones dobles no susceptibles de digestión simultánea, se realizó en primer lugar aquella cuyo tampón de digestión tenía un nivel de salinidad inferior.

m. Purificación de fragmentos de ADN

Para la purificación de fragmentos de ADN a partir de bandas obtenidas por electroforesis (ya sea en agarosa o poliacrilamida) se empleó el kit de extracción GeneJET (ThermoFisher) siguiendo las instrucciones del proveedor.

n. Desfosforilación de fragmentos de ADN

Los plásmidos digeridos sobre los cuales se pretendía ligar un fragmento de DNA purificado se desfosforilaron en sus extremos 5' para evitar posibles religaciones en el proceso de ligación. La desfosforilación se realizó con la fosfatasa alcalina de gamba ártica o SAP (ThermoFisher) y el tampón suministrado junto a la enzima por el proveedor. Se sometió al tratamiento con fosfatasa el total de la digestión durante media hora a 37°C, y posteriormente se inactivó a 65°C durante 15 minutos.

o. Ligación de fragmentos de ADN

Para las reacciones de ligación entre ADN plasmídico desfosforilado e insertos purificados de electroforesis se utilizó la ADN-ligasa del fago T4 (Promega). Esta enzima cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre los extremos 5'P y 3'OH de las moléculas de ADN. Se asegura una ligación direccional empleando al menos un extremo protuberante. Para la reacción se empleó una relación molar vector:inserto 10:1, empleando un volumen máximo de ligación de 10 µL, incubando a 15°C o/n.

p. PCR de colonias

Para determinar que los insertos en los vectores tienen el tamaño adecuado antes de hacer extracción de ADN, se realizaron PCRs analíticas en 30 colonias. La composición de la reacción es la misma que en la PCR convencional, cambiando únicamente el molde y la polimerasa:

- Molde: colonia resuspendida en 10 μ L de TE [Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM pH 8,0], de la cual se emplearon 5 μ L.
- Polimerasa: Taq polimerasa (Biotools) termoestable de *Thermus aquaticus* expresada en *E. coli*.

Los cebadores empleados para la comprobación de cada plásmido se reflejan en la Tabla 20.

Tabla 20. Cebadores para PCR de colonias.

Plásmido a analizar	Cebadores
PCR-Blunt II-TOPO con deleciones del dominio C-terminal antes de pasar a p35-Tunos	M13 y 336
P35Tunos-Vec01-NAT1 con deleciones del dominio C-terminal	195 y 196

Los amplicones se visualizaron en gel de agarosa del 1,5% (p/v).

q. Secuenciación de ADN

Para la secuenciación se hizo uso de un servicio externo de secuenciación (Secugen). Se prepararon 15 μ L de muestra de ADN a una concentración de 100 ng/ μ L. Según el plásmido enviado a secuenciar se emplearon unos u otros cebadores:

Tabla 21. Cebadores para la secuenciación.

Plásmido	Cebadores
pENTR/D-TOPO	T7 y M13
PCR-Blunt II-TOPO	T7 y SP6
pEAQ-HT-DEST1	319 y 320
p35Tunos-Vec01-NAT1	195, 196 y 336

5. Producción y purificación de VNPs

a. Infección de plantas

Para la purificación de VNPs del tipo viriones, se requiere la infección de numerosos ejemplares de *B. juncea*. Para ello, el primer paso fue preparar un preinóculo a partir de 5 plantas de *N. benthamiana* infectadas.

Si el virus a purificar ya se había purificado con anterioridad, la inoculación se realizó con ese virus previo a concentración 1 mg/ml, diluido 1:50 en agua destilada. En el caso de que la construcción no se hubiera purificado con anterioridad, la inoculación se realizaba directamente con el plásmido infeccioso.

La inoculación mecánica se hizo en ejemplares de *N. benthamiana* en estado fenológico de 3-4 hojas verdaderas (aproximadamente veintidós días tras el semillado), marcando las dos hojas de crecimiento más reciente y rociándolas con carborundo para inducir microlesiones en el tejido. A continuación, 5 µL del inóculo se depositaron en el haz de las hojas seleccionadas y se extendió por toda la superficie de la hoja con ayuda de un capilar de vidrio ejerciendo una ligera presión.

Transcurridas dos semanas, las hojas que presentaban síntomas de estos cinco ejemplares se recolectaron y trituraron en 5 mL de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.5. Con este extracto se inocularon las plantas de *B. juncea* en estadio de 4-5 hojas verdaderas (21 días aproximadamente), de nuevo marcando las dos hojas de crecimiento más reciente y rociándolas con carborundo. En este caso, para la inoculación mecánica se emplearon hisopos empapados en el extracto.

Las plantas infectadas se dejaron crecer durante cuatro semanas antes de proceder a la purificación.

b. Agroinfiltración de plantas

Para la purificación de VNPs del tipo VLPs, se requiere la agroinfiltración de, al menos, treinta ejemplares de *N. benthamiana* siguiendo un protocolo previamente descrito (Sainsbury y Lomonosoff, 2008) con ligeras modificaciones. Para ello, se preparó un volumen de cultivo de 300 mL de la construcción en *A. tumefaciens* (10 mL

por planta aproximadamente). En caso de realizar una agroinfiltración con fines analíticos, solo se requerían 5 plantas por construcción (50 mL de cultivo).

Una vez transcurrido el periodo de incubación en medio líquido de crecimiento, se procedió a cambiar a medio de agroinfiltración MMA (Tabla 10). Para ello, se midió la DO_{600} y se calculó la cantidad de cultivo necesaria para alcanzar una DO_{600} final de 1,2. Esa cantidad de cultivo se centrifugó a $2000 \times g$, se descartó el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en MMA y se incubó durante 3 horas a $24^{\circ}C$ con agitación leve (120 rpm).

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las plantas de *N. benthamiana* en estado de 8-10 hojas verdaderas (aproximadamente treinta y cinco días) se agroinfiltró en el envés de las hojas con ayuda de una jeringa de 2 mL. Las plantas se dejaron crecer durante 12-14 días antes de purificar.

c. Purificación de VNPs

Para la purificación de nanopartículas se siguió un protocolo previamente descrito (Spence, 1992). Brevemente, el tejido de la planta se trituró en tampón fosfato potásico 0,5 M pH 7,5, con relación 1:2 (p/v) en una batidora eléctrica, a $4^{\circ}C$. La suspensión resultante se extrajo con un volumen de cloroformo a $4^{\circ}C$. Las fases se separaron por centrifugación, la fase acuosa se filtró a través de Miracloth.

A continuación, las VNPs se precipitaron con 6% de PEG 6000 (p/v) y 4% de NaCl (p/v). Se dejaron precipitar durante 90 minutos a $4^{\circ}C$. Las partículas se recuperaron por centrifugación durante 10 min a $12\,000 \times g$. El sedimento se resuspendió durante la noche en fosfato potásico 0,5 M pH 7,5 con EDTA 10 mM. La solución se clarificó por centrifugación (10 min a $9000 \times g$) y las VNPs se sedimentaron (2 h a $80\,000 \times g$). El sedimento se resuspendió en fosfato potásico 0,25 M pH 7,5, EDTA 10 mM, y se añadió CsCl hasta una densidad final de $1,27 \text{ g/cm}^3$.

La solución resultante se sometió a centrifugación a $150\,000 \times g$ durante 18 h a $4^{\circ}C$. Se recuperó una banda visible en el gradiente que contenía las partículas, perforando el tubo con jeringa y aguja. Se diluyó en fosfato potásico 0,25 M pH 7,5, EDTA 10 mM y se sedimentó por centrifugación (2 h a $80\,000 \times g$). Finalmente, el sedimento se resuspendió en 50% de glicerol (v/v), Tris-HCl 5 mM pH 7,5 EDTA 5 mM y se almacenó a $-20^{\circ}C$ hasta su uso posterior.

Una vez purificadas, la concentración se determinó espectrofotométricamente, siguiendo la ley de Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot C \cdot L$), donde ϵ es el coeficiente de extinción molar de los potyvirus, el cual está establecido en 2,65 ($A_{0,1\%, 1\text{cm}}$ a 260nm). La relación 260/280 debe encontrarse entre 1,14 y 1,25 para considerar niveles de contaminación mínimos (Hollings y Brunt, 1981).

6. Diseño de VNPs modificadas genéticamente

Se diseñaron varias VNPs, algunas de ellas consistentes en derivatizaciones con péptidos mediante fusión genética y otras de ellas mutantes de delección del propio virus en su CP.

a. VNPs delecionadas en el dominio N-terminal

Las VLPs sin modificar así como las delecionadas en el dominio N-terminal, se diseñaron con anterioridad en el laboratorio (Ibort, 2011), realizando PCRs con el uso de cebadores que dieron lugar a amplicones de distinto tamaño. Se realizaron 5 reacciones de PCR para las distintas construcciones, la de la CP del virus sin modificar y 4 delecciones: $\Delta 27$, $\Delta 54$, $\Delta 81$ y $\Delta 108$. Los cebadores empleados para cada construcción se muestran en la Tabla 22. Los cebadores en 5' fueron diseñados con la secuencia CACC seguida del codón que codifica para una metionina inicial ATG, la diana Nae I para posibles clonaciones secundarias por enzimas de restricción y luego la secuencia de la CP donde quiere realizarse la delección. El cebador en 3' consiste en la secuencia final del dominio C-terminal con el codón STOP y la diana Xho I para posibles clonaciones futuras por enzimas de restricción.

Tabla 22. Construcciones y cebadores de VLPs delecionadas en el dominio N-terminal y VLP sin modificar.

Construcción	Cebadores
VLP-CPwt	CP-VLP-Fw y CP-VLP-Rv
VLP- $\Delta 27$ -CP	$\Delta N27$ y CP-VLP-Rv
VLP- $\Delta 54$ -CP	$\Delta N54$ y CP-VLP-Rv
VLP- $\Delta 81$ -CP	$\Delta N81$ y CP-VLP-Rv
VLP- $\Delta 108$ -CP	$\Delta N108$ y CP-VLP-Rv

Una vez obtenidos los amplicones, se empleó el producto de PCR para la clonación direccional en pENTR/D-TOPO, que posteriormente pasó a pEAQ-HT-Dest1 para transformar *Agrobacterium*.

b. VNPs delecionadas en el dominio C-terminal

En el caso de VNPs delecionadas en el dominio C-terminal, se realizaron tanto en VLPs como viriones. Para VLPs se diseñaron 3 deleciones: $\Delta 215-288$, $\Delta 246-288$ y $\Delta 272-288$. Para viriones, solo se realizaron las dos últimas.

Los fragmentos correspondientes a los genes de las CPs delecionadas se produjeron por PCR, diseñando los cebadores en 5' con la secuencia inmediatamente anterior a la deleción y terminada en el codon STOP. En 3' se empleó el cebador para la VLPwt, consistente en la secuencia CACC seguida del codón de inicio de la metionina ATG y a continuación la secuencia N-terminal de la CP de TuMV. Los cebadores empleados para cada construcción se muestran en la Tabla 23.

Tabla 23. Construcciones y cebadores de VLPs delecionadas en el dominio C-terminal.

Construcción	Cebadores
VLP- $\Delta 215-288$ -CP	$\Delta C215$ y CP-VLP-Fw
VLP- $\Delta 246-288$ -CP	$\Delta C246$ y CP-VLP-Fw
VLP- $\Delta 272-288$ -CP	$\Delta C272$ y CP-VLP-Fw

Una vez obtenidos los amplicones, se empleó el producto de PCR para la clonación direccional en pENTR/D-TOPO, que posteriormente pasó a pEAQ-HT-Dest1 para transformar *Agrobacterium*.

En cuanto a los viriones, se encargaron genes sintéticos GeneArt Strings®. TuMV, entre las dianas únicas *Mlu* I y *Sal* I tiene la CP completa, además de un fragmento que codifica para parte de la NIB y otra secuencia que (entre otras) incluye la secuencia PoliA. Para poder hacer la construcción de virus infeccioso delecionado se empleó otra diana interna, este caso *Acc* I, que se encuentra justo tras la CP y antes del poliA.

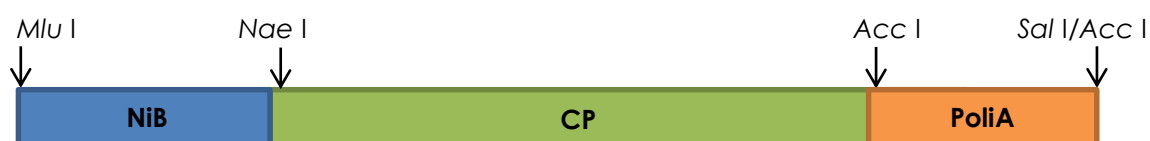


Figura 13. Fragmento del clon infeccioso p35Tunos-Vec01-NAT1 desde las dianas de restricción *Mlu* I y *Sal* I.

Se diseñaron las construcciones para las CP delecionadas desde *Mlu* I hasta *Acc* I (justo al finalizar la CP), seguidas de un espacio de varias decenas de nucleótidos para terminar con la diana *Sal* I.

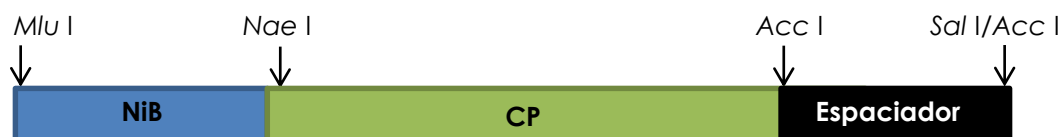


Figura 14. Diseño de genes sintéticos para viriones con la CP delecionada en el dominio C-terminal.

Una vez confirmada la secuencia de la construcción en pCR-Blunt II-TOPO, hubo que incluir la secuencia PoliA en la construcción partiendo de otra construcción en este vector que incluía la secuencia. Para ello se digirieron ambos vectores con *Acc* I (Tabla 3), capaz de reconocer también la diana *Sal* I, de manera que se obtuvieron dos cortes correspondientes al fragmento pequeño a intercambiar. Se purificó el fragmento correspondiente al PoliA de un gel de poliacrilamida seguido del protocolo del GeneJET y se sometió a tratamiento con fosfatasa el vector con la secuencia de la CP delecionada. Ambos fragmentos se ligaron juntos, dando lugar al fragmento completo en el vector pCR-Blunt II-TOPO.

De nuevo, una vez confirmada la secuencia de la construcción, se digirió el plásmido resultante para intercambiar el fragmento *Mlu* I-*Sal* I en el plásmido infeccioso p35Tunos-Vec01-NAT1, el cual además portaba una proteína verde fluorescente (GFP) cuya secuencia se había insertado entre la de las proteínas P1 y HC-Pro. Una vez realizada la digestión en ambos plásmidos, se purificó el fragmento de pCR-Blunt II-TOPO y se sometió a tratamiento con fosfatasa el plásmido p35Tunos-Vec01-NAT1. Posteriormente se realizó una ligación y se obtuvo el correspondiente vector con la CP delecionada en el dominio C-terminal.

Ya con la secuencia del vector final confirmada, éste se empleó para la inoculación de cinco ejemplares de *N. benthamiana*, pudiendo realizar un seguimiento de la infección por sintomatología y por fluorescencia de la GFP.

c. VNPs de Hsp60

El diseño de nanopartículas portadoras del péptido de Hsp60 301-320 fue realizado en estudios previos (Cruz-Fernández, 2011; El ouazizi, 2010).

Para la construcción de viriones con el péptido fusionado en el N-terminal de la CP se realizaron PCR solapantes hasta obtener el fragmento que va desde la secuencia *Mlu* I a *Nae* I del virus incluyendo la secuencia del péptido. Se clonó en PCR-Blunt II-TOPO para su digestión con las enzimas de restricción mencionadas para después pasar al vector infeccioso p35Tunos-Vec01-NAT1.

En el caso de VLPs, partiendo de la construcción en virión se emplearon nuevos cebadores que generaban un amplicón correspondiente a la CP con el péptido fusionado. A este amplicón por nuevas reacciones de PCR se le incluyeron secuencias de pEAQ-HT-Dest1 que permitían su inserción en el vector de expresión mediante digestión con enzimas de restricción y posterior ligación en el vector. Una vez clonado en pEAQ-HT-Dest1 se transformó *Agrobacterium*.

d. VNP de VIP

Para este péptido no se realizó la construcción en viriones debido a su longitud, considerada excesiva para permitir la infectividad según experiencias previas.

Se realizaron dos construcciones de VLPs, una con el péptido fusionado al N-terminal de la CP, y otra con el péptido fusionado al N-terminal de la delección $\Delta 54$. En ambos casos, se encargaron genes sintéticos GeneArt Strings®, que consistían en:

- Secuencia CACC para la inserción direccional en pENTR/D-TOPO.
- Secuencia del codón de iniciación para la metionina ATG.
- Secuencia en nucleótidos del péptido, optimizada para *N. benthamiana* por el propio software de diseño de genes sintéticos (ThermoFisher).
- Secuencia de la CP de TuMV (delecionada o sin deleccionar) terminada en el codón STOP.

Una vez recibidos los genes sintéticos, se emplearon como producto de PCR para la clonación direccional en pENTR/D-TOPO, que posteriormente pasó a pEAQ-HT-Dest1 para transformar *Agrobacterium*.

e. VNP de Tpn I

El diseño de nanopartículas portadoras del péptido Taquiplesina I (Tpn I) fue realizado en estudios previos (Kellnerová, 2018). Se decidió realizar únicamente VLPs debido a que las potenciales aplicaciones de la plataforma estarían dirigidas

a protección vegetal, donde es imprescindible la ausencia de infectividad en posibles huéspedes. En este caso también se encargaron genes sintéticos, siguiendo las mismas especificaciones que en el caso anterior, fusionando la Tpn I a la CP sin modificar.

7. VNPs derivatizadas por conjugación química

La conjugación química de distintos compuestos se realizó en dos residuos aminoacídicos de la CP: cisteína y lisinas. Se realizó conjugación tanto en VLPs como en viriones.

7.1. Conjugación química a cisteína

La conjugación química al grupo sulfhidrilo de la cisteína se realizó con distintos compuestos a través del mismo grupo funcional: un iodoacetil.

a. VNPs conjugadas con compuesto fluorescente

La reacción de alquilación se inició mediante la adición a las VNPs de un exceso molar de 30X de I-AEDANS, seguido de una incubación a temperatura ambiente durante dos horas en oscuridad. La reacción de alquilación se terminó mediante la adición de un exceso molar de 10X de ditioneitol (DTT) a las muestras, y una incubación de 5 minutos.

La visualización de la conjugación se realizó mediante SDS-PAGE y posterior visualización por tinte y por incidencia de luz UV en un transiluminador GelDoc (Bio-Rad).

b. Conjugación de un compuesto biotinilado

Para la conjugación química del compuesto biotinilado EZ-Link™ iodoacetil-PEG₂-biotina a VNPs de TuMV, se añadió un exceso molar de 4X del reactivo biotinilado a la preparación del virus. La reacción se mezcló y se incubó en oscuridad durante 90 minutos a temperatura ambiente.

Para comprobar la conjugación, se realizaron inmunoensayos con anticuerpos tanto específicos del virus como de biotina.

c. Conjugación de VIP a VNPs

El péptido VIP se conjugó a las VNPs a través del reactivo de entrecruzamiento heterobifuncional Sulfo-SIAB (ThermoFisher). Primero, se añadió un exceso molar 30X del reactivo a la solución de VNPs y se incubó en oscuridad durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió un exceso molar 10X de VIP a la reacción, que se dejó a temperatura ambiente sin luz o/n. Para muestras control, se aplicó el mismo protocolo sin la adición del reticulante.

La conjugación se comprobó por inmunoensayos con anticuerpos específicos de TuMV y de VIP.

7.2. Conjugación química a lisinas

Diferentes compuestos fueron conjugados a las VNPs por el mismo grupo funcional: NHS éster. Previamente, se requiere un intercambio de tampón debido a las aminas presentes en el tampón Tris. Las VNPs se centrifugaron (50 minutos, 50 000 x g, 4°C) y luego se resuspendieron en HEPES 10 mM, pH 7,5.

a. Conjugación a VNPs de compuesto fluorescente

Para la conjugación química del Alexa Fluor™ 555 NHS Ester (TermoFisher) a VNPs de TuMV, se añadió un exceso molar 20X de reactivo Alexa Fluor a la preparación de VNPs. La reacción se mezcló y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente o/n.

El análisis de la conjugación se realizó mediante SDS-PAGE y posterior visualización por tinte y por incidencia de luz UV en un transiluminador GelDoc (Bio-Rad).

b. Conjugación indirecta de compuesto fluorescente a VNPs

Para conjugaciones adicionales de diferentes compuestos, se comprobó la eficacia de la ligación de Staudinger mediante la adición de Alexa Fluor™ 488 Azide (Sigma) (Hermanson, 2013b; Schilling y col., 2011; Tam y Raines, 2009)). La ligación comenzó con la adición de un exceso molar 10X de NHS-Fosfina (ThermoFisher) a la preparación de VNPs a una concentración de 2 mg/ml, incubados en la oscuridad a temperatura ambiente o/n. El exceso de NHS-Fosfina se eliminó por centrifugación (50 minutos, 50 000 x g, 4°C) y luego se resuspendió a una concentración final de 1 mg/ml. La suspensión resultante se incubó con un exceso molar 20X de reactivo fluorescente. La reacción se mezcló y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente o/n.

La conjugación resultante se analizó mediante SDS-PAGE y posterior visualización por tinte y por incidencia de luz UV en un transiluminador GelDoc (Bio-Rad).

c. Conjugación de VIP a VNPs

El péptido VIP se sintetizó con un ácido azidopentanoico conjugado en el extremo N-terminal (Caslo). La conjugación siguió las mismas condiciones que las descritas previamente, usando NHS-Fosfina para conjugar el péptido mediante ligación de Staudinger. Después de la reacción entre las VNPs y el reactivo de fosfina, se añadió un exceso molar 10X de VIP modificado, se mezcló y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente o/n.

La conjugación se comprobó por inmunoensayos con anticuerpos específicos de TuMV y de VIP.

d. Conjugación química de macromoléculas no portadoras de grupo azido.

En el caso de querer conjugar proteínas de mayor tamaño u otras macromoléculas que no contengan el grupo azido necesario para la ligación de Staudinger, se empleó un conector que posee ese grupo funcional: NHS-PEG₄-Azida, que se unirá a las aminas primarias de los compuestos. Se partió de una solución de la

macromolécula en HEPES, a la que se añadió un exceso molar 10X de conector, se mezcló e incubó en oscuridad a temperatura ambiente o/n. Para eliminar el exceso de conector se emplearon columnas PD MiniTrap G-10 (Healthcare Life Sciences), siguiendo las instrucciones del proveedor. Una vez recuperada la molécula derivatizada con azida, se añade un exceso 10X de este complejo a VNPs derivatizadas con fosfina para dar lugar a la ligación de Staudinger, mezclando los complejos e incubando en oscuridad a temperatura ambiente o/n.

La conjugación se comprobó por inmunoensayos con anticuerpos específicos de TuMV y de las macromoléculas empleadas.

7.3. Multiderivatización de VNPs

Las VNPs sin modificar y genéticamente modificadas con un péptido derivado del receptor 3 del factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGFR-3) (Sánchez y col., 2013) se conjugaron químicamente con dos compuestos diferentes en dos residuos diferentes: iodoacetil-PEG₂-biotina y Alexa Fluor™ 555 NHS éster. Se incubaron VNPs en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 10 mM con un exceso molar 4X iodoacetil-PEG₂-biotina, se mezclaron y se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente. El exceso de compuesto biotinilado se eliminó por centrifugación (50 minutos a 50 000 x g, 4°C) y luego se resuspendió en HEPES 10 mM, pH 7,5. Las VNPs resultantes se incubaron con un exceso molar 10X de compuesto Alexa Fluor, se mezclaron y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente o/n.

La conjugación resultante se analizó mediante SDS-PAGE y posterior visualización por tinte y por incidencia de luz UV en un transiluminador GelDoc (Bio-Rad), además de inmunoensayos con anticuerpos específicos de TuMV, VEGFR-3 y biotina.

8. Formación de nano/micromallas

Se siguió el protocolo descrito anteriormente (Cuenca y col., 2016), empleando distintas relaciones (v/v) de virión a 1 mg/ml y glutaraldehído (GA) para definir el nivel de intrincado de la malla. El exceso de glutaraldehído se eliminó con el uso de filtros Amicon® (Merck) con un tamaño de exclusión de 3 kDa.

9. Manipulación y caracterización de VNPs

a. Extracción de proteína total de tejido vegetal

Los extractos a partir del material agroinfiltrado se prepararon siguiendo un protocolo descrito previamente (Sainsbury y Lomonossoff, 2008). Para ello se tomó una sección circular de 44 mm de diámetro (correspondiente a unos 75 mg de tejido sano sin agroinfiltrar, para poder calcular el rendimiento). El tejido se homogeneizó en 225 μ L de tampón de extracción de proteína total [Tris-HCl 50 mM, pH 7,25; NaCl 150 mM; EDTA 2 mM; Triton-X-100 0,1% (v/v)]. Tras un proceso de centrifugación de un minuto a 13 000 rpm a 4°C se conservó el sobrenadante a -80°C tras congelarlo en nitrógeno líquido.

b. Determinación de la concentración de proteínas

Para el cálculo de la concentración de proteínas se empleó el método Bradford (Bradford, 1976), basado en el cambio del máximo de absorbancia que se genera al reaccionar la proteína con el reactivo Coomassie, pasando de 465 nm, a 595 nm.

Para determinar la concentración de proteínas se empleó como patrón una recta de calibrado con BSA de concentración conocida (de 0 a 10 μ g/ml), donde las ordenadas representan la concentración de proteínas y las abscisas la DO_{595} . La pendiente de la recta obtenida junto con la DO_{595} de las muestras a analizar se utilizó para estimar la concentración de proteína en las muestras.

c. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Se realizó electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes siguiendo el sistema de Laemmli (Laemmli, 1970) para visualizar la movilidad electroforética asociada a las distintas construcciones de VNPs. Para ello se realizaron geles discontinuos, con un gel concentrador del 4% (p/v) de poliacrilamida, seguido de uno separador del 12,5% (p/v). La composición de los mismos se detalla en la

Tabla 24.

Tabla 24. Composición geles de poliacrilamida para electroforesis de proteínas.

Componente	Concentrador	Separador
Poliacrilamida 30% (p/v)	4% (p/v)	12,5% (p/v)
Tris-HCl 1M pH 8,0	-	375 mM
Tris-HCl 0,5M pH6,8	125 mM	-
SDS	0,1% (p/v)	0,1% (p/v)
PSA	0,05% (p/v)	0,0125% (p/v)
TEMED	0,1% (p/v)	0,05% (p/v)

Las muestras se prepararon con tampón de carga 2X [Tris-HCl pH 6,8 125mM, glicerol20% (v/v), SDS 4% (p/v), 2-mercaptoetanol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,002% (p/v)], se calentaron a 100°C durante 5 minutos y se cargaron en el gel a continuación. Se emplearon como marcadores de peso molecular:

- Amersham ECL High-Range Rainbow Molecular Weight Marker (GE Healthcare).
- Broad-Range SDS-PAGE Standards (Bio-Rad).

La electroforesis se realizó en el equipo Mini PROTEAN® Tetra cell (BioRad) en tampón de electroforesis [Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM pH 8,5, SDS 0,1% (p/v)] a un voltaje de 60V en la fase de concentración y 150V en fase de separación.

Una vez finalizada la electroforesis, se pudieron seguir 3 tratamientos:

- Teñido con InstantBlue™ Protein Stain (Expedeon).
- Visualización bajo luz UV en transiluminador Gel-Doc (Bio-Rad).
- Transferencia a membrana.

d. Hibridación en membrana e inmunodetección (Western-Blot)

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Trans-Blot Transfer Medium, Bio-Rad) en tampón de transferencia [tampón de electroforesis con metanol al 20% (v/v)]. La membrana se bloqueó con leche desnatada al 2% (p/v) en PBS-Tween [fosfato sódico 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05% (v/v)] a 4°C o/n.

Una vez finalizado el bloqueo, la membrana se lavó durante 5 minutos con PBS-Tween y se incubó con el anticuerpo primario siguiendo las especificaciones reflejadas en la Tabla 2. Finalizada la incubación, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS y a continuación se incubó la membrana con el anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina y volvió a lavarse 3 veces con PBS durante 5 minutos. Las incubaciones con anticuerpo primario y secundario se prolongaron durante 1 hora a TA. Para el revelado, las membranas se expusieron a NBT-BCIP hasta visualizar las bandas, deteniendo la reacción añadiendo agua destilada.

e. Hibridación directa en membrana e inmunodetección (Dot-Blot)

Sin pasar por un paso previo de SDS-PAGE, las muestras a concentración conocida (dependiente del ensayo) se depositaron en forma de gotas de 10 µL sobre una membrana de PVDF en seco, hasta su completa absorción. A continuación, la membrana se trató del mismo modo que en un WB, desde el bloqueo, incubación con anticuerpos y revelado.

f. ELISA indirecto

Se realizaron inmunoensayos de este tipo tanto para la caracterización en la producción de nuevas nanopartículas como para determinar la presencia de anticuerpos en sueros. El ensayo consistió en un ELISA indirecto (Lin, 2015) en el que se siguieron 4 pasos: tapizado, incubación con anticuerpo primario, incubación con anticuerpo secundario conjugado y revelado. El tiempo de incubación y la temperatura en cada caso dependió del ensayo en cuestión.

Tabla 25. Ensayos de ELISA indirecto.

Ensayo		Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
1	Anti-poty para analizar la producción de VNPs	Anti-poty	Anti-ratón AP
2	Análisis de sensibilidad de VNPs-Hsp60	Diluciones seriadas Anti-Hsp60 D307	Anti-conejo AP
3	Análisis de autoanticuerpos anti-Hsp60 en modelo murino	Sueros de ratón	Anti-ratón AP
4	Análisis de sensibilidad de VNPs-VIP	Diluciones seriadas Anti-VIP	Anti-conejo AP

Para el tapizado se emplearon cantidades de VNPs entre 700-1000 ng, así como la cantidad de péptido o proteína equivalente a la cantidad presente en VNPs funcionalizadas. Se empleó un tampón de extracción [Carbonato sódico 50mM pH 9,6; PVP 40 1% (p/v)]. En todos los casos el tapizado se realizó a 4°C o/n. Tras el tapizado, los ensayos que implicaron sueros tuvieron un paso adicional de bloqueo con PBS-Tween con BSA al 5% (p/v).

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS-Tween. A continuación, se procedió a añadir el anticuerpo primario diluido en tampón conjugado [fosfato sódico 10 mM, NaCl 150 mM, PVP40 1% (p/v), Tween20 0,05% (v/v), BSA 2% (p/v)] y se incubó una hora a temperatura ambiente (ensayos 1, 2, 4 y 5 Tabla 25) o a 4°C o/n (ensayo 3).

De nuevo, al finalizar la incubación se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS-Tween y se añadió el anticuerpo secundario diluido en tampón conjugado. La incubación se prolongó durante 1-4 horas a TA, dependiendo del ensayo. Tras otros tres lavados de 5 minutos se añadió el sustrato p-nitrofenilfosfato sódico para revelar las placas.

Al añadir el sustrato y entrar este en contacto con la fosfatasa alcalina de los anticuerpos secundarios se desencadenó una reacción colorimétrica. Se midió la absorbancia a 405 nm a distintos tiempos, absorbancia que se correlaciona con la presencia de anticuerpos.

g. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para la visualización de nanopartículas ensambladas se prepararon rejillas tanto de níquel cubiertas con formvar, como de cobre cubiertas con carbón, ambas con una malla de 400. La rejilla se colocó sobre una gota de 10 µL de la muestra a visualizar y se incubó durante 15 minutos a TA. A continuación, se realizaron tres lavados de 3 minutos con agua destilada y se tiñeron con acetato de uranilo al 2% (p/v) para el contraste. Las muestras se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión (JEM 1400).

h. Microscopía electrónica de inmunoadsorción (ISEM)

Siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado anterior, y antes de teñir con el acetato de uranilo, las rejillas se incubaron con el anticuerpo deseado a una dilución estandarizada 1:100, durante 1 hora a TA. Después, nuevamente se realizaron los lavados y se tiñó con acetato de uranilo al 2% (p/v).

10. Criomicroscopía electrónica y procesamiento de imagen

Se aplicó la solución con las partículas de TuMV en una rejilla Quantifoil R2/2 cubierta con una fina capa de carbón y seguidamente se llevó a cabo la vitrificación de la muestra en un FEI Vitrobot. La recogida de datos se realizó en un microscopio electrónico Titan Krios FEI de 300kV con una cámara de detección directa K2 (GATAN). Los fotogramas de las imágenes se obtuvieron a una magnificación nominal de $\times 130\,000$, teniendo como resultado un muestreo de $1.1\text{ \AA}/\text{pixel}$. La exposición fue de 9 segundos mediante conteo de electrones, lo cual resultó en imágenes con 40 fotogramas y una dosis total de $40\text{ e}/\text{\AA}^2$. El movimiento entre fotogramas se corrigió en las propias micrografías (Li y col., 2013) usando los fotogramas del 3 al 31, resultando en una dosis acumulada de $30\text{ e}/\text{\AA}^2$.

La función de transferencia de contraste de fases de las micrografías se estimó usando el programa CTFFIND4 (Rohou y Grigorieff, 2015). Mediante Relion2 se seleccionó un set de datos que resultó en 444 678 segmentos. El mapa de densidad de criome también fue calculado en Relion2 (He y Scheres, 2017). Gracias a rondas de clasificación 2D y clasificación de partículas se pudieron aislar 335 228 partículas, las cuales corresponden a segmentos de buena calidad. El procesamiento de imagen de este nuevo conjunto de imágenes se empezó con un cilindro como mapa de referencia y así se pudo obtener un mapa de criome refinado a una resolución de 5 \AA .

La optimización local del paso de hélice y el giro de la hélice se llevó a cabo durante el refinamiento 3D, ajustando los parámetros en -40.8° para el giro de la hélice y 4 \AA para el paso de hélice. La simetría helicoidal en el espacio real fue impuesta al mapa final para obtener homogeneidad a lo largo de todas las unidades asimétricas para el modelado atómico.

11. Modelo atómico para la CP de TuMV

Se usó como modelo para el modelado atómico la estructura de la CP del WMV (PDB: 5ODV) (Zamora y col., 2017). La densidad para una subunidad de TuMV CP se aisló del mapa de criome mediante segmentación en Chimera (Pettersen y col., 2004), siguiendo el método de Segger (Pintilie y col., 2010). La segmentación correspondía a la CP de WMV, por lo que se procedió a cambiar los aminoácidos que difieren entre las CP de WMV y TuMV para crear el propio modelo de TuMV. Todo este proceso se llevó a cabo en Coot (Emsley y col., 2010), así como el ajuste del modelo atómico en el mapa de densidad y un posterior modelado del modelo atómico. La estereoquímica del modelo se mejoró mediante refinamiento en el espacio real en Phenix (Adams y col., 2010). Después de varios ciclos iterativos de modelado y optimización, se mejoraron las interrelaciones entre subunidades adyacentes usando un refinamiento final en Phenix mediante simetría no cristalográfica. Para el ssRNA, se incluyó en el refinamiento una cadena poliU modelada. La estructura final fue validada en MolProbity (Chen y col., 2010).

12. Ensayos de actividad antimicrobiana

Para los ensayos de actividad antimicrobiana se emplearon las cepas descritas en la Tabla 1, (excepto *Agrobacterium*) como patógenos representativos tanto humanos como fitopatógenos, siendo todos del tipo Gram – (salvo *S. lutea*).

Se prepararon cultivos en medio líquido, a partir de los cuales se prepararon diluciones para alcanzar un valor de 0,5 en la escala de turbidez de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC) mediante densitometría del cultivo a una DO_{600} . Las diluciones se prepararon en todos los casos en medio mínimo (Tabla 12).

Parte de este cultivo se empleó en ensayos en placas no suplementadas con antibióticos, aplicando 1 mL de cultivo a la placa, extendiendo el volumen por la superficie y eliminando el exceso. Una vez el cultivo fue completamente absorbido por el medio con agar, se situaron los discos de antibiograma (ThermoFisher), suplementados con 15 μ L del tratamiento antimicrobiano escogido. La actividad antimicrobiana de los tratamientos se determinó midiendo el diámetro del halo de inhibición generado en torno al disco de antibiograma.

Por otro lado, se realizaron ensayos en medio líquido, empleando placas de cultivo (Nunc®). En ellas se empleó la misma cantidad de tratamiento que el empleado en los discos de antibiograma, utilizando en este caso 100 µL de cultivo diluido para evaluar la actividad antimicrobiana, que se midió en términos de DO₆₀₀. Los distintos tratamientos escogidos se reflejan en la Tabla 26.

Tabla 26. Tratamientos antimicrobianos.

Tratamiento	Medio sólido	Medio líquido
Kanamicina	Sí	Sí
Tpn I libre	Sí	Sí
TuMV wt	Sí	Sí
TuMV conjugado con Tpn I	Sí	Sí
Malla TuMV	No	Sí
Malla TuMV-Tpn I	No	Sí

Nota: Los tratamientos correspondientes a nanomallas no se emplearon en ensayos en placa.

13. Programas informáticos

a. MacVector

Se empleó el software de MacVector™ (Oxford Molecular Ltd.). en todas las tareas relacionadas con diseño de vectores, cebadores, clonación por dianas de restricción y predicción de geles de agarosa para análisis de digestiones y amplicones de PCR.

También se empleó este sistema para el análisis de secuenciación y alineamientos de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos.

b. UCSF Chimera

Se empleó el software de Chimera 1.11.2 para generar imágenes de los modelos estructurales tanto de la CP como del ensamblado de TuMV. Gracias a este programa se pudieron seleccionar los residuos empleados para conjugación química y localizarlos espacialmente, así como evaluar otras secuencias de interés como regiones inmunogénicas detectadas por anticuerpos.

c. XLStat

Paquete estadístico para Microsoft Excel. Se empleó para el análisis estadístico preliminar de los ensayos realizados con sueros de ratón. Se escogió el estadístico U de Mann Whitney, una prueba no paramétrica aplicada a dos muestras independientes.

d. Adobe Photoshop

Se empleó el software de Adobe Photoshop para el retoque fotográfico de algunas figuras y la preparación y maquetado de las mismas.

IV. RESULTADOS

CAPÍTULO 1

ESTRUCTURA DE NANOPARTÍCULAS DE T_uMV OBTENIDA MEDIANTE CRIOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de modelos en tres dimensiones de estructuras virales se hace cada vez más necesario, ya sea para un estudio en profundidad de la estructura en sí misma y su relación con otros virus de morfología similar (Agirrezabala y col., 2015), o para una evaluación más exhaustiva de las posibles aplicaciones de los virus como nanopartículas (Le y col., 2017b). La técnica para la obtención de estos modelos ha implicado generalmente la cristalización de partículas para el análisis atómico mediante técnicas cristalográficas, pero esta metodología se emplea principalmente en virus de simetría icosaédrica, como es el caso de CPMV (Lin y col., 1999). Además, en virus con esta simetría han sido posibles estudios estructurales no solo de los viriones, sino también de VLPs, donde se puede evaluar la implicación estructural de los ácidos nucleicos (Huynh y col., 2016).

En lo referente a virus de morfología helicoidal rígida, como es el caso de los tobamovirus como TMV, también se ha logrado determinar su estructura por difracción de rayos X a una resolución de 2,9 Å (Kendall y col., 2007; Namba y col., 1989; Wang y Stubbs, 1994). Además, técnicas alternativas como la criomicroscopía electrónica han permitido alcanzar un nivel de resolución bastante elevado, obteniendo su estructura a una resolución de 3,35 Å (Sachse y col., 2007).

Para el estudio de virus helicoidales flexibles, como los potyvirus o los potexvirus, la aproximación que requiere el empleo de técnicas cristalográficas no es viable, ya que la flexibilidad y flexuosidad de la cápsida viral no permiten su cristalización. Es por ello que, en los últimos años, se ha abordado su estudio estructural mediante técnicas de menor poder resolutivo tales como difracción de rayos X de baja resolución, microscopía electrónica de barrido (SEM) o criomicroscopía electrónica (CriOME) (Baratova y col., 2001; Kendall y col., 2013; Kendall y col., 2008). Estas técnicas permitieron determinar la simetría de los virus flexuosos, su similitud entre familias y la cantidad aproximada de subunidades por vuelta que presentan, pero la posición concreta de los residuos aminoacídicos de la proteína de la cápsida seguía siendo desconocida, recurriendo en estos casos al modelado informático.

Un desarrollo tecnológico cada vez más avanzado ha permitido que técnicas como la CriOME hayan permitido alcanzar niveles de resolución de aproximadamente 4 Å en virus con estructura flexuosa, de manera que en los últimos años se ha podido conocer con mayor precisión la estructura de virus flexibles pertenecientes al género

potexvirus como PepMV (Agirrezabala y col., 2015; Donchenko y col., 2017), o incluso al género potyvirus, como es el caso de WMV (Zamora y col., 2017).

Centrándonos en WMV, perteneciente al mismo género que TuMV, las características estructurales descritas confirman que la proteína de la cápsida se distribuye en tres dominios: un dominio central o "core" del cual surgen los dominios N- y C-terminales. Si bien es cierto que la criomicroscopía electrónica ha permitido una localización concreta de la mayoría de residuos de la cápsida viral, aquellos localizados en las regiones más distales de los dominios no se han podido resolver, debido a que presentan cierto grado de libertad de movimiento y no se puede atribuir a estas regiones una posición concreta en el espacio.

Algunas de las características más relevantes obtenidas de la estructura de este potyvirus no son únicamente aquellas relacionadas con el diámetro o ángulo, sino que han podido evaluarse exhaustivamente las interacciones producidas entre subunidades adyacentes y los residuos implicados en la interacción con el ARN viral. Hasta el momento, los estudios estructurales realizados en virus con estructura similar a los potyvirus, como son los potexvirus, se han realizado principalmente en viriones, aunque existen estudios en lo referente a la estructura en nanopartículas tipo virus (VLPs) con una resolución baja (Donchenko y col., 2017), trabajo donde no se aborda específicamente la implicación estructural de los ácidos nucleicos.

Gracias a estos últimos estudios (Agirrezabala y col., 2015; Donchenko y col., 2017; Zamora y col., 2017) y en colaboración con el grupo de criome de macromoléculas biológicas (CICbioGUNE) se ha podido resolver no solo la estructura propia del TuMV, sino también de sus VLPs, determinando las alteraciones estructurales que pueden aparecer debido a la ausencia del ARN, así como las posibles modificaciones en las interacciones entre subunidades.

RESULTADOS

1. Resolución de la estructura de TuMV

Se partió de la estructura de WMV (material suplementario)(Zamora y col., 2017) para elaborar un modelo estructural de TuMV basado en homología, mediante el software SwissModel (Waterhouse y col., 2018), obteniendo una homología del 62,8%. Este modelo incluyó los residuos 66 al 272 de un total de 288 (cobertura de 0,72), debido a que parte de los dominios N- y C-terminales de WMV no están resueltos en la estructura original de criOME (Zamora y col., 2017). Una vez obtenido el modelo de la CP individual, se realizó un modelo 3D de 24 subunidades, de nuevo por homología respecto de la geometría de WMV. Se muestra en la Figura 15 un alineamiento de las secuencias de las CPs de ambos virus (para comparar las secuencias en detalle, ambos virus se encuentran en el alineamiento disponible entre el material suplementario).

```

WMV NC_006262 C 1 SCKEAVENLDAGKDSKKDTSGKGDKPQNSQTG--QGSKEQTKTGTVSKDVNVGSKGK-EVPRLQKITKKMNLPTVGGKIILSLDH 82
TuMV NC_002509 1 AGETLDAGLTDQKQAEKEKKEREKAERERQQLALKKGKDVAQEEGKRDKEVNAGTSGTFSVPRLKSLTSKMRVPRYEKKRVALNLDH 90
          * * * * *
WMV NC_006262 C 83 LLEYKPNQVDLFNTRATKTQFESWYSAVKVEYDLNDEQMGVIMNGFMVWCIDNGTDPDVNGVWVMMDGEEQVEYPLKPIVENAKPTLQI 172
TuMV NC_002509 91 LIITYPEQTDLSNTRSTRKQFDTWFEQVMADYELTEDKMQIILNGLMVWCIDNGTSPNMGWVMMDDGDDQVEFPKPLIDHAKPTLQI 180
          * * * * *
WMV NC_006262 C 173 MHFSDAAEAYIEMRNSESYPMPRYGLLRNLRDRELARYAFYFEVTSKTPNRAREIAQMFAAALAGINSRLFGLDGNIISTNSENTERH 262
TuMV NC_002509 181 MAHFSDAEAYIEKRNQDRPYMPRYGLQRNLTDMSLARYAFYFEMTSRTPIRAREAHIQMFAAALRGANNLFLGLDGNVGTVENTERH 270
          * * * * *
WMV NC_006262 C 263 TARDVNQNMHTLLGMGPPQ 281
TuMV NC_002509 271 TEDVNRMHNLGLVQGL 288
          * * * * *

```

Figura 15. Alineamiento de las secuencias de las CPs de WMV y TuMV. En magenta se representa el dominio N-terminal, con los aminoácidos no resueltos en la estructura original de WMV que se representan en blanco. Lo mismo ocurre con el dominio C-terminal, en este caso en color azul. Aparecen marcados en verde los aminoácidos principales implicados en el "bolsillo" de interacción con el ARN. Los asteriscos señalan los residuos coincidentes en ambas secuencias.

Tras el desarrollo de este modelo, surgió la posibilidad de colaborar con el CICbioGUNE para realizar la criomicroscopía electrónica de viriones de TuMV. Una vez resuelta la estructura con una resolución de 5Å, se pudo comparar con la modelada anteriormente, estableciendo un nivel de similitud superior al 99%. La superposición de los monómeros se muestra en la Figura 16. Ambos archivos PDB se incluyen en el material suplementario.

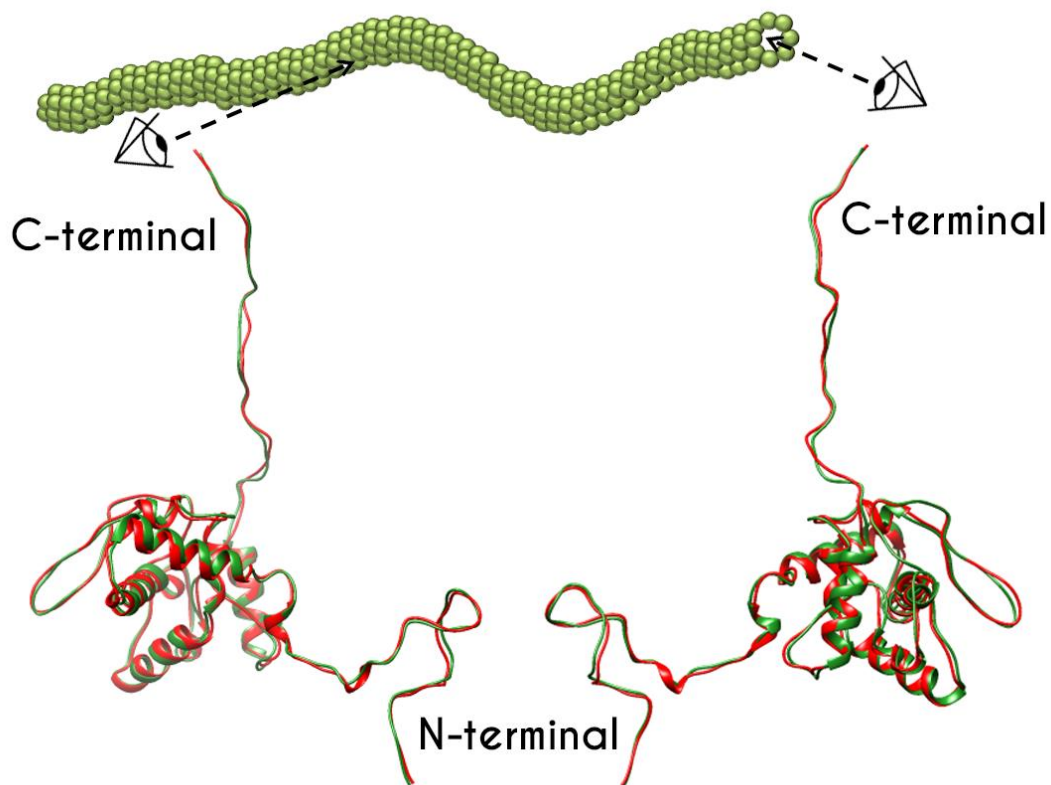


Figura 16. Homología entre las estructuras de la CP de TuMV del modelo desarrollado a partir de la CriOME de WMV (rojo) y la CriOME del propio TuMV (verde). Coincidencia de 206/208 residuos (RMSD = 0,946Å). Derecha: Visión desde la superficie del virión. Izquierda: Visión desde el poro del virión.

Se puede observar la coincidencia casi total entre ambas estructuras, que conservan la estructura original de WMV donde la proteína de la cápsida consta de un núcleo central o “core” muy compacto y rico en alfa hélices, del cual parten los dominios N- y C-terminales en forma de brazos flexibles intrínsecamente desordenados. El dominio N-terminal comprende los aminoácidos 1-97, apareciendo representados en la estructura del 66 en adelante; y el dominio C-terminal los aminoácidos 245-288, apareciendo representados en la estructura hasta el 272.

Una vez obtenida la estructura del monómero, se pudo obtener un modelo del ensamblado, con 19 subunidades, donde realizar las medidas y análisis oportunos de la estructura completa de TuMV. Este ensamblado muestra una simetría helicoidal con giro a la izquierda, con unas 8,8 subunidades por vuelta. El diámetro interno es de aproximadamente 42 Å, y el externo de en torno a 134 Å, como se muestra en la Figura 17.

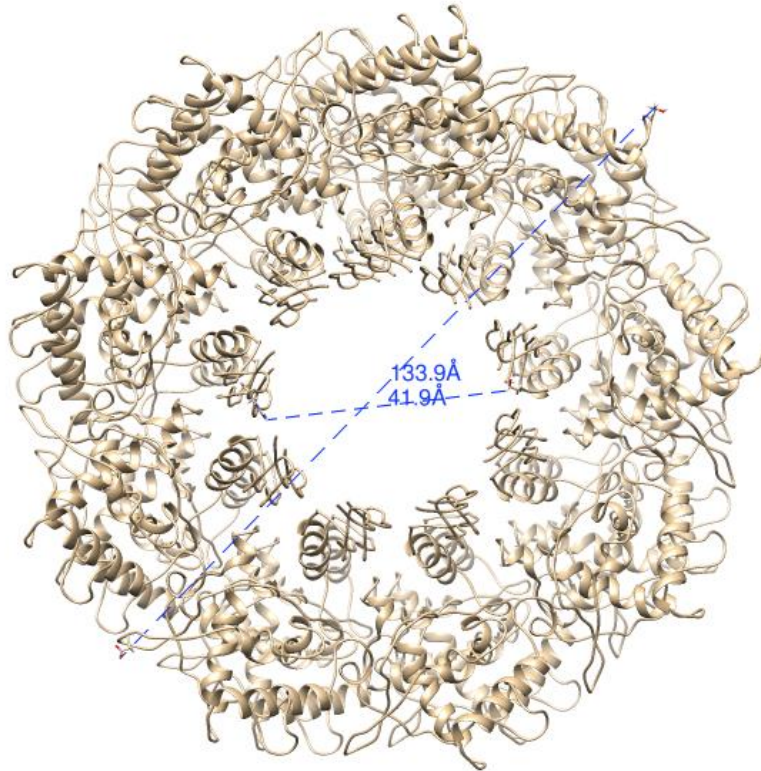


Figura 17. Estructura ensamblada de TuMV. Se muestran los diámetros interno y externo aproximados del virus ensamblado.

2. Interacciones entre subunidades

Al igual que en el caso del WMV, las subunidades de TuMV se ensamblan creando interacciones a través del dominio N-terminal y el dominio central en la superficie externa del virión. La subunidad “n” interacciona gracias a su dominio N-terminal con la subunidad inmediatamente posterior (n+1) y con aquella que está 10 posiciones por delante en el siguiente giro de vuelta (n+10). Por otro lado, el dominio central de la subunidad “n” interacciona a su vez con las subunidades inmediatamente anterior (n-1) y 10 posiciones por detrás en el anterior giro de vuelta (n-10). Las interacciones que tienen lugar entre la subunidad “n” con las subunidades “n-1”, “n+1” y “n+10” se muestran en la Figura 18, donde la subunidad “n” aparece representada con su potencial electrostático, la “n-1” en amarillo, la “n+1” en verde y la “n+10” en rosa.

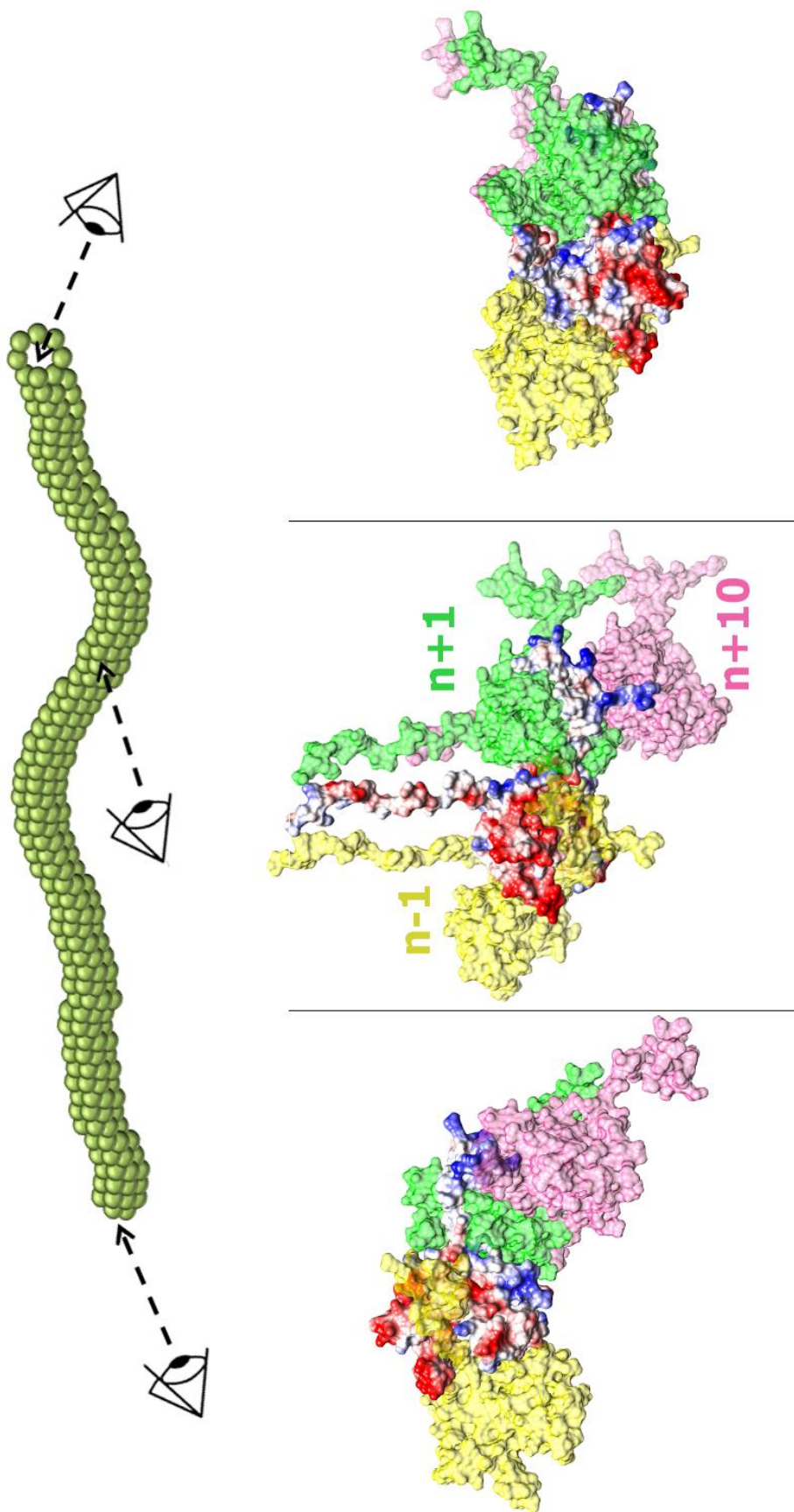


Figura 18. Interacciones entre subunidades desde distintos puntos de vista. Se muestra la interacción entre la subunidad "n", donde aparece representado su potencial electrostático (negativo en rojo, positivo en azul, neutro en blanco) con la subunidad inmediatamente anterior (n-1), posterior (n+1) y la subunidad 10 posiciones por delante (n+10). El primer panel muestra una visión axial posterior, donde se encuentran más expuestos los dominios N-terminales, el segundo muestra la visión lateral externa y el tercero la visión axial anterior, donde queda expuesto el dominio C-terminal.

De acuerdo a esta imagen, se observa que los dominios N-terminales actúan como anclaje de dos maneras. En primer lugar, se genera un acoplamiento entre subunidades adyacentes independiente de carga, ya que el dominio N-terminal de la subunidad n (región con potencial electrostático neutro) encaja estéricamente con la región central de la subunidad $n+1$ (también zona con potencial electrostático neutro). Por otro lado, la interacción con subunidades más lejanas se realiza mediante la zona del dominio N-terminal con potencial electrostático positivo en la subunidad n , que se une a la zona del dominio central con potencial electrostático negativo de la subunidad $n+10$. Para comprender estas implicaciones de los potenciales electrostáticos, éstos y las regiones con las que tienen interacciones se muestran en detalle en la Figura 19.

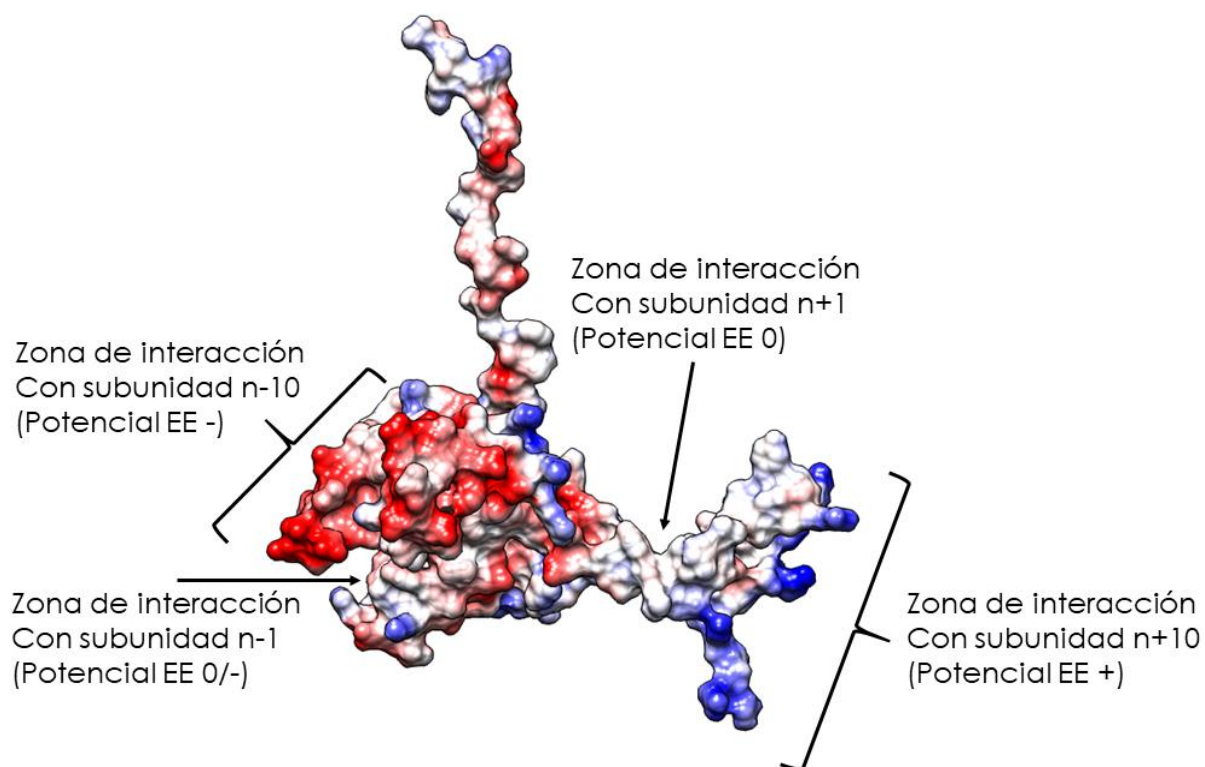


Figura 19. Potencial electrostático de la CP de TuMV. Se representan en rojo las regiones con potencial electrostático negativo, en blanco neutro y en azul positivo. Aparecen señaladas las regiones de interacción con distintas subunidades y su potencial.

Según el potencial de las distintas regiones, se puede concluir que las interacciones a corta distancia (entre subunidades inmediatamente adyacentes en el mismo giro de vuelta) son menos dependientes del potencial, ya que las zonas que interaccionan entre subunidades contiguas presentan un potencial neutro, donde no

aparecen apenas fuerzas de atracción o repulsión, siendo el propio plegamiento de la proteína el que permite que las distintas zonas encajen entre sí. Por otro lado, las interacciones entre subunidades más alejadas (10 posiciones, en otro giro de vuelta) se producen entre zonas con distinto potencial electrostático, y por tanto dependientes de la carga. De esta forma, el dominio N-terminal tendría una doble función de soporte, tanto en anclaje lateral como apoyo a la polimerización helicoidal.

En lo referente al dominio C-terminal, presenta un potencial principalmente electronegativo, lo que generaría fuerzas de repulsión entre los dominios C-terminales de las distintas subunidades, aportando turgencia a la pared interna del virión, y por tanto permitiendo que se forme el canal interior.

3. Interacción con ARN

En lo que se refiere a la interacción con el ARN, al igual que en WMV, la CP de TuMV forma un “bolsillo” entre el dominio central y el dominio C-terminal, donde se asienta el ARN. Como se muestra en la Figura 15, los aminoácidos más relevantes en esta interacción se encuentran conservados en ambas especies, pero en este caso hay otros residuos implicados en el anclaje del ARN a la estructura del virión. En la Figura 20 se representa la localización del ARN (rojo) en la CP así como en la estructura completa del virión, además de los aminoácidos más importantes en la interacción.

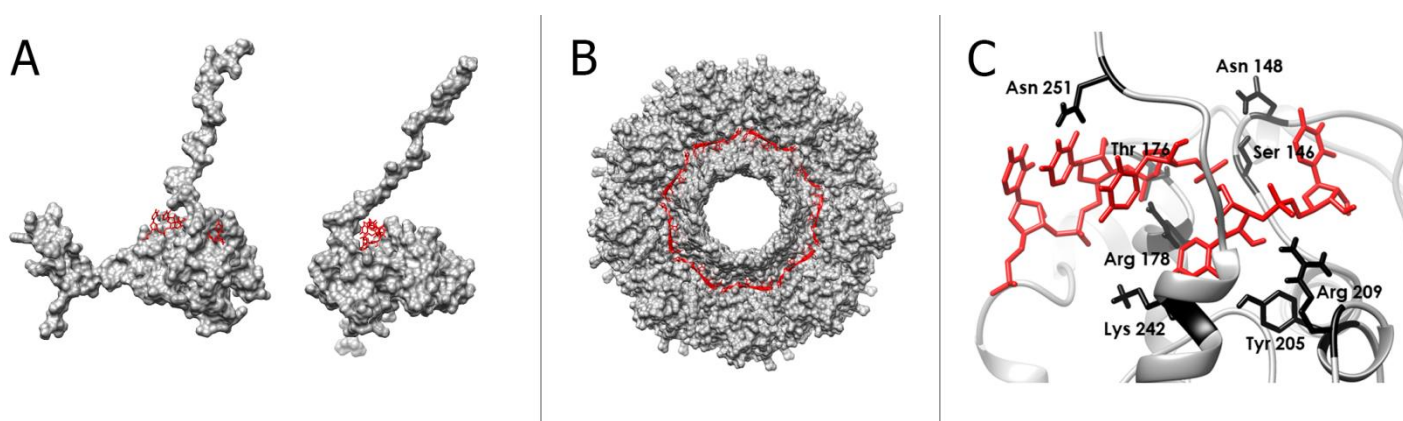


Figura 20. Interacción de la CP con el ARN del virión. A. Vista del “bolsillo” de ARN en una subunidad con visión desde el poro interno del virión (izquierda) y lateral de la CP (derecha). B. Visión axial del ARN en la estructura del virión completo. C. Detalle del bolsillo de ARN, con los aminoácidos más relevantes implicados en la interacción.

Se observa claramente la formación de un hueco entre el dominio C-terminal y el dominio central de la CP, donde se asienta el ARN. Los aminoácidos implicados en la formación de este bolsillo están ampliamente conservados, y todos ellos se encuentran en el dominio central de la proteína.

4. Estructura de VLPs

Además de obtener la estructura específica de viriones de TuMV, también se obtuvieron imágenes de criome de VLPs del mismo virus, donde poder evaluar las modificaciones que aparecen en ausencia de ARN. La estructura obtenida, aunque muy similar, tuvo que analizarse partiendo de grupos clasificados sin simetría, obteniendo dos modelos diferentes: modelo A (representa un 42%) y modelo B (representa un 22%), ambos con una resolución en torno a 8Å, cuyos archivos PDB se incluyen entre el material suplementario.

En ambos modelos se observa una estructura muy similar a la del virión, conservando las proporciones, con la misma cantidad de subunidades por giro de vuelta, así como los mismos diámetros interno y externo. Las mayores diferencias se encuentran en los dominios N-terminales y algunas hélices, cuyas interacciones cambian respecto de la estructura del virión y se salen de la estructura simétrica, como puede verse en la Figura 21. Estas regiones del modelo atómico fuera del mapa de densidad se corresponden con las zonas del dominio N-terminal que establecen uniones entre subunidades, así como dos hélices largas localizadas en el dominio central: una entre los aminoácidos 102-117 (justo al comienzo del dominio N-terminal) y otra entre los aminoácidos 180-192 (zona que participa en la interacción con el dominio N-terminal). Esto se traduce en una partícula más flexible y con uniones más laxas entre subunidades.

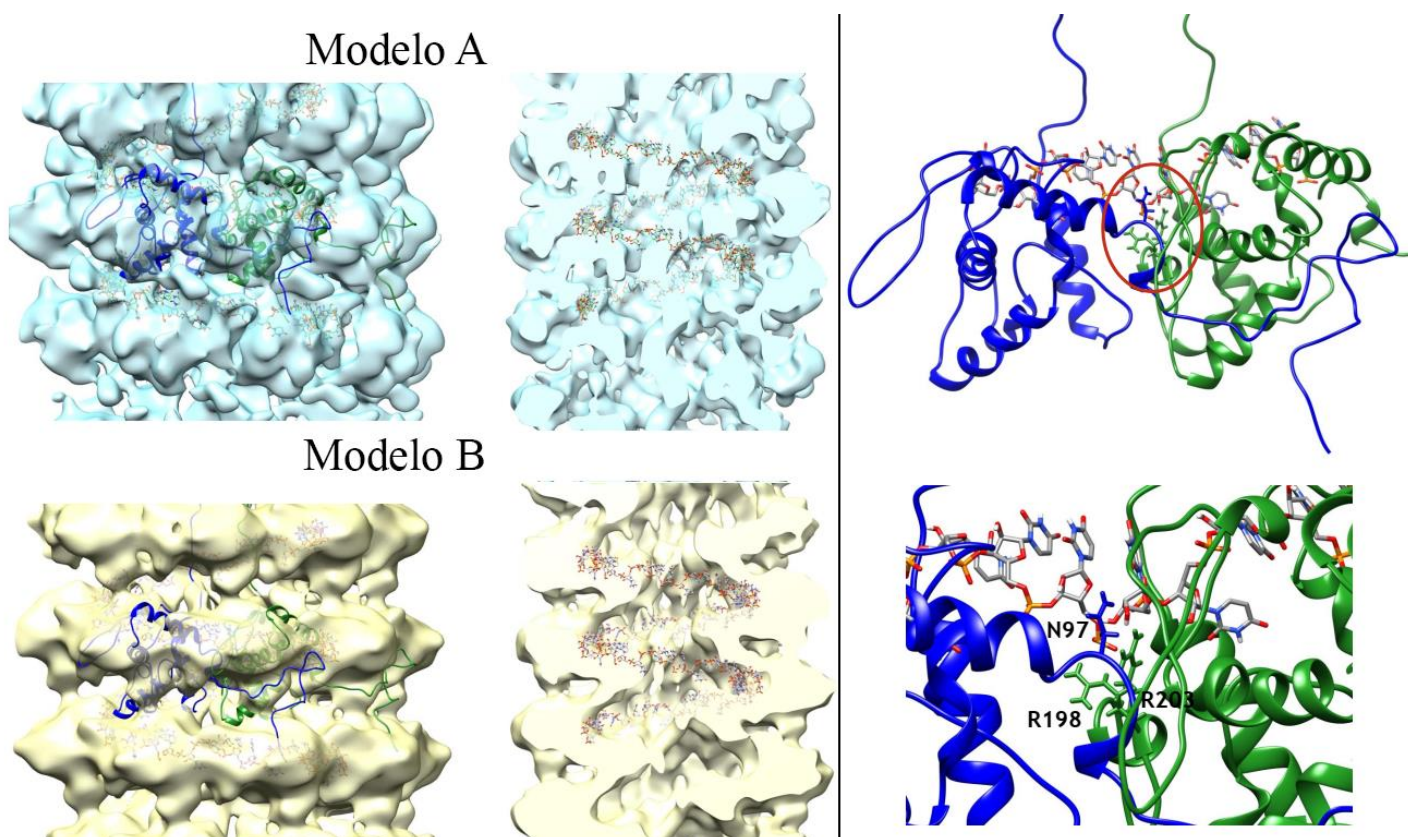


Figura 21. Modelos de la estructura de VLPs. Panel izquierdo, en azul claro se representa el modelo A, en amarillo el modelo B. Se han marcado en azul oscuro y verde dos subunidades, donde pueden verse hélices saliendo fuera del mapa de CrioEM. Estas subunidades se ven en detalle en el panel derecho, donde se analizan posibles interacciones con el ARN de las hélices que se encuentran fuera del mapa de CrioEM.

Una posible interpretación del porqué de la modificación de estas regiones sería que el ARN podría interaccionar con algunos de los residuos implicados, interacciones que se representan en la región derecha de la Figura 21. En el espacio entre subunidades hay una región del ARN que podría interaccionar con ambas subunidades. Por un lado, con el residuo N97, y por otro con los residuos R198 y R203 de la subunidad contigua. El N97 se encuentra entre el dominio N-terminal y la primera hélice que aparece desordenada en el modelo, la que comprende los aminoácidos 102-117. Por otra parte, los aminoácidos R198 y R203 son el punto de anclaje de la segunda de las hélices, de los aminoácidos 180-192. Si el ARN interaccionara con estos residuos, su ausencia permitirá una unión más laxa entre subunidades.

DISCUSIÓN

El conocimiento estructural de potyvirus adquirido en los últimos años, no únicamente ha supuesto un gran avance en cuanto a caracterización de virus con estructura helicoidal flexible y flexuosa, sino que además ha permitido responder cuestiones planteadas décadas atrás. Los primeros estudios realizados en virus con esta estructura mediante técnicas de baja resolución, revelaban resultados similares en cuanto a número de subunidades por vuelta o la división de la proteína de la cápsida en un dominio central del cual partían los dominios N- y C-terminales (Baratova y col., 2001; Kendall y col., 2013; Kendall y col., 2008; McDonald y col., 2010; Stubbs y col., 2008). Sin embargo, otras características estructurales planteadas en su día ahora adquieren una respuesta diferente.

Los modelos estructurales previos, además de otras evidencias como la digestión suave con tripsina (Shukla y col., 1988), suponían que tanto el dominio N-terminal como el C-terminal se encuentran expuestos en la superficie del virión (Anindya y Savithri, 2003). Sin embargo, gracias a los avances obtenidos mediante criME, se ha podido determinar que, al menos parte del dominio C-terminal, se encuentra en la región interna del poro (Agirrezabala y col., 2015; Le y col., 2017a; Lee y col., 2014; Zamora y col., 2017). Además, se ha planteado una nueva hipótesis en la que, debido a las interacciones electrostáticas, este dominio podría estar implicado en mantener la estructura del poro interno del virión, lo que podría ser consistente con hipótesis previas de que ambos dominios (N- y C- terminales) son imprescindibles para el ensamblado (Anindya y Savithri, 2003) y que además son las interacciones que se producen entre estos dominios flexibles con otras subunidades las que aportan flexibilidad a la estructura del virión (DiMaio y col., 2015). Debido a la imposibilidad de localizar espacialmente en una posición concreta los últimos aminoácidos de la proteína de la cápsida por la dispersión en esa región en el mapa de criME (Zamora y col., 2017), hay interrogantes que aún no pueden responderse, como el porqué de la accesibilidad a la digestión por tripsina si el dominio está en el interior del poro.

Por otro lado, las hipótesis planteadas respecto al dominio N-terminal sí se mantienen, encontrándose expuesto en la superficie del virus. Estos resultados concuerdan no solo con los obtenidos en la tripsinización del virión (Shukla y col., 1988), sino con los ensayos de antigenicidad (Shukla y col., 1989), donde este dominio se muestra como inmunodominante respecto al resto de la proteína de la cápsida.

Además, no solo se han confirmado las hipótesis previas, sino que un conocimiento más profundo ha permitido determinar las regiones implicadas en la interacción entre subunidades y, por tanto, implicadas en el ensamblado. Estos datos permitirán en un futuro considerar las distintas regiones del dominio para futuras funcionalizaciones, no solo teniendo en cuenta posibles impedimentos estéricos, sino también la disponibilidad de diversos grupos funcionales en la superficie expuesta del virión para conjugación química, cada vez más empleada en este tipo de nanopartículas (Le y col., 2017b; Lee y col., 2014; Pokorski y Steinmetz, 2011; Steinmetz y col., 2010; Wen y col., 2015).

En lo referente a la interacción con el ARN, la localización de aquellos aminoácidos implicados en el bolsillo de unión de nuevo supone un gran avance en cuanto a la comprensión de las interacciones estructurales que existen en el virión. Sin embargo, es en ausencia de este ARN donde encontramos el mayor avance logrado en este estudio: obtener la estructura de VLPs de un potyvirus, ya que existen escasos estudios referidos a virus icosaédricos (Huynh y col., 2016), y aún menos respecto a virus helicoidales flexibles, además de presentar resoluciones menores (Donchenko y col., 2017). En nuestro estudio, el primero en un potyvirus, hemos podido determinar que la ausencia de ARN y, por tanto, de sus interacciones con la cápsida viral, permiten que la unión entre subunidades a través del dominio N-terminal sea más laxa. Este hecho podría significar un mayor acceso a la región interna de las nanopartículas, lo que ofrece importantes ventajas en el campo biotecnológico, por ejemplo, a la hora de conjugar compuestos a residuos localizados en la región interna del virus.

Todos estos resultados abren el camino a nuevas aplicaciones biotecnológicas con nanopartículas del *Virus del mosaico del nabo* y otros potyvirus, permitiendo desarrollar nuevas estrategias de funcionalización desde un conocimiento más exhaustivo de la estructura de las partículas, así como de las posibles implicaciones que pueda tener la funcionalización en sí en el mantenimiento estructural de las partículas.

CAPÍTULO 2

IMPLICACIÓN DE LOS DOMINIOS FLEXIBLES DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE TUMV EN EL ENSAMBLADO DE NANOPARTÍCULAS

INTRODUCCIÓN

El empleo de nanopartículas derivadas de virus de plantas con simetría helicoidal que además sean flexuosos para aplicaciones biotecnológicas mediante fusión genética se aborda ampliamente tanto en la presente tesis como en otros estudios publicados sobre el *Virus del mosaico del nabo* (González-Gamboa y col., 2017; Sánchez y col., 2013) y sobre otros virus de plantas con estructura similar (Esfandiari y col., 2016; Le y col., 2017b; Lee y col., 2014; Lico y col., 2006; Shukla y col., 2014). Sin embargo, los virus con estructura flexuosa presentan ciertas limitaciones estructurales que impiden su funcionalización con péptidos de cierto tamaño o características, lo que limita de manera considerable la posible explotación biotecnológica de este tipo de sistemas nanoparticulados (Lico y col., 2006; Pokorski y Steinmetz, 2011).

Por este motivo, entre otros, una tendencia creciente es la derivatización química sustituyendo a la fusión genética, si bien es cierto que las características intrínsecas de esta última siguen considerándose lo suficientemente relevantes como para buscar alternativas que permitan su utilización para un mayor número de funcionalizaciones. La fusión genética asegura que todas las subunidades de la cápsida viral presenten el péptido escogido, el cual siempre tendrá la misma orientación y residuos expuestos. Es por ello que la caracterización de este tipo de nanopartículas es más sencilla y constante, ya que la homogeneidad en los ensayos se mantiene, y no existen diferencias entre distintos ensayos: la misma cantidad de nanopartículas siempre estará funcionalizada con la misma cantidad de péptido. Además, al tratarse de un sistema de producción eucariota, las modificaciones postraduccionales serán similares a las que se producen en animales, en contraposición a la producción en cultivos bacterianos, lo que supone una ventaja a la hora de aplicar estas nanopartículas a sistemas animales que requieren un reconocimiento específico que pudiera ser dependiente de dichas modificaciones.

Algunas de las alternativas para poder emplear la fusión genética en la funcionalización de nanopartículas virales consisten en el desarrollo de VLPs para aquellos casos en que la funcionalización impida una infectividad sistémica, pero no afecte al ensamblado del armazón proteico (González-Gamboa y col., 2017; Huang y col., 2005; Kalnciema y col., 2012; Kumar y col., 2009; Kushnir y col., 2012; Lomonosoff y Evans, 2014; Murawski y col., 2010; Peabody y col., 2008; Plummer y Manchester, 2011;

Tissot y col., 2010; Zeltins, 2013), o en el empleo de diversos conectores proteicos capaces de generar un espacio suficiente entre la estructura vírica y el péptido fusionado (Chen y col., 2013; Ibort, 2011).

Otra alternativa es la de generar mutantes virales en los que se modifique la secuencia de la proteína de la cápsida, ya sea para buscar un equilibrio de cargas o para aumentar el espacio disponible para la fusión de péptidos. Este último caso consiste en el diseño de mutantes de delección en los cuales se puedan suprimir las regiones expuestas de la CP sin afectar al ensamblado y/o infectividad del virus.

Los conocimientos estructurales de los potyvirus, o de virus estructuralmente similares, establecen la exposición de gran parte del dominio N-terminal hacia el exterior de la estructura del virión, presentando no solo exposición al solvente, sino además cierto nivel de flexibilidad, lo que indica que probablemente no esté implicado en el ensamblado del virión (Agirrezabala y col., 2015; Baratova y col., 2001; McDonald y col., 2010; Narayanan y Han, 2017; Shukla y col., 1988; Shukla y col., 1994; Wang y Stubbs, 1994; Yang y col., 2012; Zamora y col., 2017). Estas características lo convierten en un buen candidato para el diseño de mutantes, en los que se delecionen ciertos segmentos del dominio. Además, existen estudios realizados en potyvirus que determinan que la carga neta del dominio N-terminal de la CP es esencial para la infectividad del virus, más incluso que la extensión del mismo (Bendahmane y col., 1999; Bendahmane y col., 2002; Dolja y col., 1995; Kimalov y col., 2004; Porta y col., 2003; Voloudakis y col., 2005). Estos estudios permiten plantear la posibilidad de delecionar gran parte o todo el dominio sin afectar al ensamblado en la formación de VLPs, aunque sí en la infectividad, más concretamente en el movimiento a larga distancia. En esos estudios también se demuestra la posibilidad de sustituir parte del dominio sin afectar a la infectividad, siempre y cuando se mantenga la carga neta.

Por otra parte, el conocimiento estructural del dominio C-terminal era más limitado hasta la publicación de la estructura de WMV (Zamora y col., 2017). Anteriormente se consideraba que se encontraba expuesto en la superficie del virión al igual que el N-terminal, por presentar ambos dominios regiones susceptibles a la tripsinización: entre 30 y 67 aminoácidos en el dominio N-terminal y entre 18 y 20 en el C-terminal, características similares a las encontradas en virus como los tobamovirus o los potexvirus (Shukla y col., 1988). Sin embargo, las características inmunogénicas del dominio C-terminal generaban dudas sobre la validez de estas hipótesis, ya que, a diferencia del dominio N-terminal, el C-terminal no presenta inmunodominancia

respecto de la región central o “core” de la CP. La presencia de anticuerpos dirigidos contra la región del C-terminal es mínima comparada con la gran inmunodominancia del dominio N-terminal (Shukla y col., 1989). Ya que una pequeña parte del dominio C-terminal no presenta una estructura susceptible de ser resuelta mediante las tecnologías actualmente disponibles, (precisamente aquella susceptible a la tripsinización), los interrogantes con respecto a este dominio siguen abiertos. Pese a todo, también se han podido desarrollar mutantes del dominio C-terminal en forma de VLPs, e incluso dobles mutantes donde se escindía parte de cada dominio, dando lugar a VLPs cada vez más cortas y rígidas (Voloudakis y col., 2005), pero no mutantes en forma de virión funcionales, ya que quedaba afectado el movimiento a larga distancia (Dolja y col., 1995).

Los estudios limitados en este contexto, así como las amplias diferencias en cuanto a secuencia y longitud de los dominios observadas entre distintos virus del mismo género plantean la necesidad de diseñar mutantes individuales para cada virus, determinando la capacidad de ensamblado y de infectividad sistémica de los mismos (Kimalov y col., 2004).

De nuevo gracias a la reciente disponibilidad de la estructura del virión, se procedió al estudio de la localización de los distintos dominios. Ya que numerosos estudios apuntan a que el dominio N-terminal está implicado en el movimiento sistémico y en la infectividad específica de huésped, así como en la transmisión por vectores (Kimalov y col., 2004; Urcuqui-Inchima y col., 2001), en el presente trabajo sólo se diseñaron deleciones en este dominio para nanopartículas en forma de VLPs. En el caso del dominio C-terminal, se realizó un estudio más profundo desarrollando deleciones en forma de virión, además de varias deleciones para formar VLPs modificadas.

Una vez determinadas las regiones prescindibles para la formación de nanopartículas virales, bien en forma de viriones, bien de VLPs, podrían ponerse en marcha nuevas estrategias de funcionalización por fusión genética con péptidos de mayor tamaño o proteínas pequeñas que en el pasado no pudieron fusionarse mediante la metodología convencional.

RESULTADOS

1. Localización de los dominios en la CP y en la estructura del virión de TuMV

Para el diseño de las deleciones, el primer paso fue localizar dentro de la estructura del virus la posición de los dominios implicados, así como su nivel de exposición al solvente. El dominio N-terminal abarca los aminoácidos 1-97, y el C-terminal la secuencia comprendida entre los aminoácidos 245-288. El primer factor a considerar fue la ausencia en la estructura publicada de la CP obtenida mediante criME (Zamora y col., 2017) de los primeros sesenta y cinco (aminoácidos 1-65 dentro del dominio N-terminal) y los últimos dieciséis aminoácidos (aminoácidos 272-288 dentro del dominio C-terminal), que no aparecen representados debido a que no existe una densidad atribuible a esta región en el mapa de criME o porque la señal se encuentra muy dispersa, de forma que no se puede establecer una posición concreta de estas zonas. Ya que en el dominio N-terminal faltaba un mayor número de aminoácidos, se diseñaron dos deleciones en esta región: la primera de los aminoácidos 1-27 y una segunda de los aminoácidos 1-54. En el caso del dominio C-terminal, se diseñó una única deleción con la región no representada en la estructura completa, es decir, de los aminoácidos 272-288.

Además de estas deleciones, se diseñaron otras deleciones que incluían los dominios terminales que aparecen representados en la estructura, y otras que implican parte del dominio central. La región de los dominios N- y C-terminales que sí aparece representada en la estructura publicada se muestra en la Figura 22, el dominio N-terminal en magenta y el dominio C-terminal en azul.

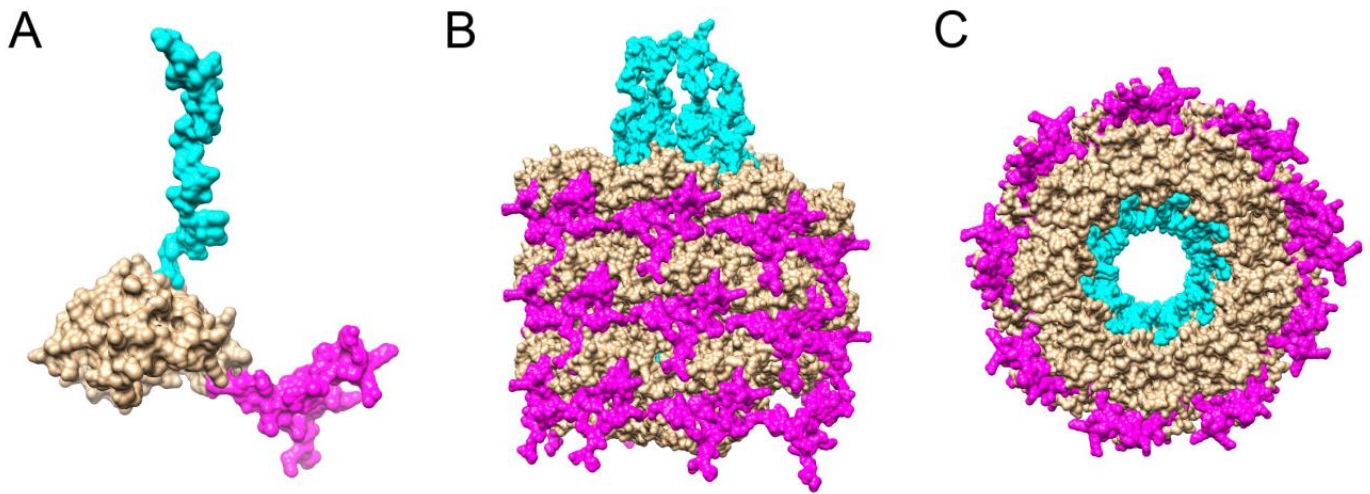


Figura 22. Localización de los dominios N- y C-terminales de la CP en TuMV. En magenta aparecen representados los aminoácidos 66-97 correspondientes al dominio N-terminal, en azul del 245-272, correspondientes al dominio C-terminal. No aparecen representados los primeros sesenta y seis ni los últimos dieciséis aminoácidos. A. Monómero. B. Visión lateral del virus ensamblado. C. Visión cenital del virus ensamblado (no aparecen representadas ni las proteínas VPg ni HC-Pro).

Considerando la susceptibilidad a la tripsinización de parte de los dominios N- y C-terminales según estudios previos (Shukla y col., 1988), y por coincidir estas regiones con parte de las zonas no resueltas en la estructura, se decidió realizar un nuevo análisis en el que se intentó localizar espacialmente la región en la que se encuentra el último aminoácido representado de cada dominio. En este caso, se representan solo siete subunidades adyacentes, formando una de las paredes del virión (Figura 23). En esta representación podemos observar que el último aminoácido del dominio N-terminal se encuentra totalmente expuesto en la superficie del virus. Por otro lado, al localizar el último aminoácido presente en la estructura del dominio C-terminal, vemos que este se encuentra en la confluencia de tres subunidades, donde se aprecia un pequeño espacio.

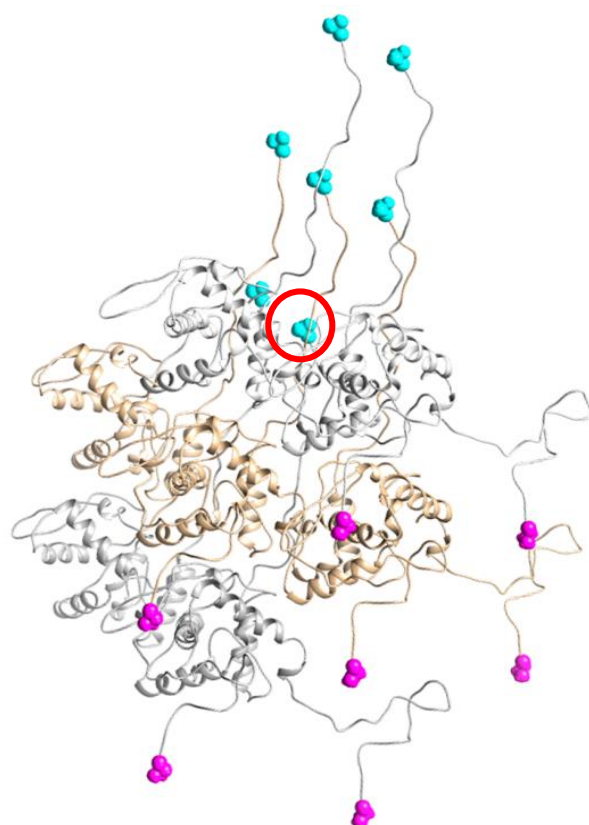


Figura 23. Localización del primer y último aminoácidos que aparecen representados en la estructura del virión. Se representan siete subunidades de una de las paredes del virión, que se localizan en tres vueltas diferentes del virión, representadas en gris y beige alternamente. En magenta aparece el primer aminoácido representado (66, N-terminal), en azul el último (271, C-terminal). El círculo rojo marca el espacio que se genera entre las subunidades donde se coloca el último aminoácido representado de cada CP. La visión representada se corresponde con la superficie externa del virión.

2. Análisis de CPs de distintos potyvirus para el diseño de deleciones en TuMV

Se alinearon cuarenta y nueve secuencias de distintos miembros del género potyvirus (alineamiento incluido en el material suplementario) para los diseños de las distintas deleciones. Se decidió realizar deleciones que implicasen el dominio completo (para el C-terminal) o casi completo (en el N-terminal), además de dos deleciones adicionales que implicaran parte del dominio central.

El dominio N-terminal es la región más variable entre distintos miembros del género potyvirus, tanto en longitud como en secuencia, por lo que se diseñaron tres

deleciones de múltiplos de veintisiete aminoácidos. La primera delección fue de veintisiete aminoácidos, región ausente en muchos de los virus considerados, y la segunda de cincuenta y cuatro. En este caso, salvo los últimos tres aminoácidos (DKD) que están ampliamente conservados, el resto de la secuencia también está ausente en gran parte de los virus considerados, ya que presentan CPs más cortas, y en los que las diferencias suelen encontrarse en este dominio. Estas dos primeras deleciones implican casi toda la región que no aparece representada en la estructura del virión. La última que afecta al dominio N-terminal fue de ochenta y un aminoácidos, cercana a implicar el dominio completo. Por último, se evaluó una delección de ciento ocho aminoácidos para incluir una pequeña región del core cercana al dominio N-terminal.

En el caso del dominio C-terminal, debido a su menor extensión, únicamente se realizaron dos deleciones. La primera implicaba los últimos dieciséis aminoácidos (272-288), aquellos que no aparecen representados en la estructura del virión. La segunda abarcaba los aminoácidos 246-288, escindiendo el dominio C-terminal por completo. Se diseñó una última delección desde el aminoácido 215 hasta el final de la CP para implicar la región central cercana al dominio C-terminal.

Las deleciones escogidas aparecen representadas en la Tabla 27, así como la nomenclatura empleada en el trabajo, marcada en negrita.

Tabla 27. Deleciones de la CP de TuMV.

Dominio N-terminal		Dominio C-terminal	
N27	Δ 1-27	C272	Δ 272-288
N54	Δ 1-54	C246	Δ 246-288
N81	Δ 1-81	C215	Δ 215-288
N108	Δ 1-108		

3. Mutantes en forma de VLPs

Se analizaron todas las deleciones diseñadas en forma de VLPs, agroinfiltrando ejemplares de *N. benthamiana* con las construcciones pertinentes y evaluando la producción a los 12 días mediante un ELISA antipoty en los extractos de proteína de hojas agroinfiltradas. Los ensayos se revelaron según la metodología descrita, cuyos resultados de absorbancia a 405 nm se muestran en la Figura 24.

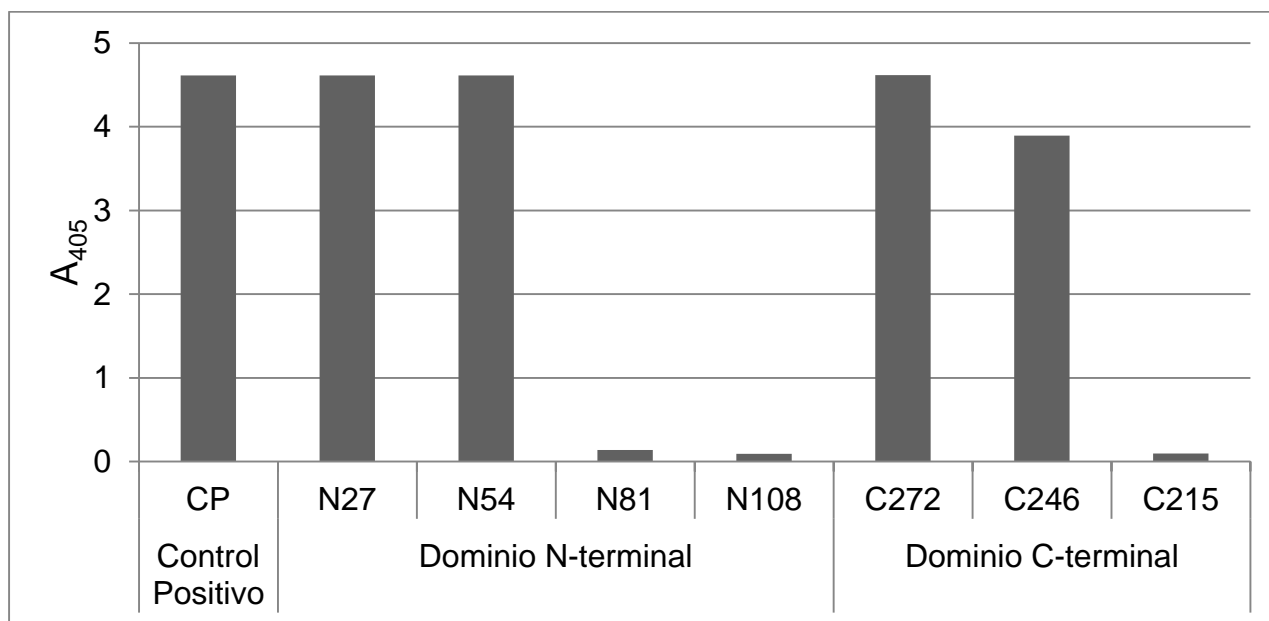


Figura 24. ELISA anti-poty de extractos de proteínas en hojas agroinfiltradas con las distintas construcciones.

Según estos resultados, solo la región de estructura no resuelta del dominio N-terminal puede ser escindida, mientras que el dominio C-terminal completo puede suprimirse sin afectar a la capacidad de producción de la proteína de la cápsida. Según nuestra propia experiencia, una señal positiva en ELISA indica no solo la capacidad de producción de la proteína, sino también de ensamblar, ya que siempre va asociada a su visualización mediante TEM.

Se realizó una agroinfiltración para purificar tres de las delecciones con las que se obtuvo señal positiva en ELISA, la máxima para el dominio N-terminal (N54), que escinde la mayor parte de la región no resuelta en la estructura, y las dos del dominio C-terminal (C272 y C246), una para la región no resuelta y otra que escinde el dominio completo. Se logró purificar todas las construcciones, que se analizaron por TEM para determinar el mantenimiento de la integridad de las partículas, así como posibles modificaciones en su estructura.

Algunas de las micrografías obtenidas se muestran en la Figura 25, que revelan distintos comportamientos de cada construcción respecto de las VLPs sin modificar (VLPs-wt). En comparación con las VLPs sin modificar (VLPs-wt), vemos que las delecionadas muestran ciertas diferencias estructurales.

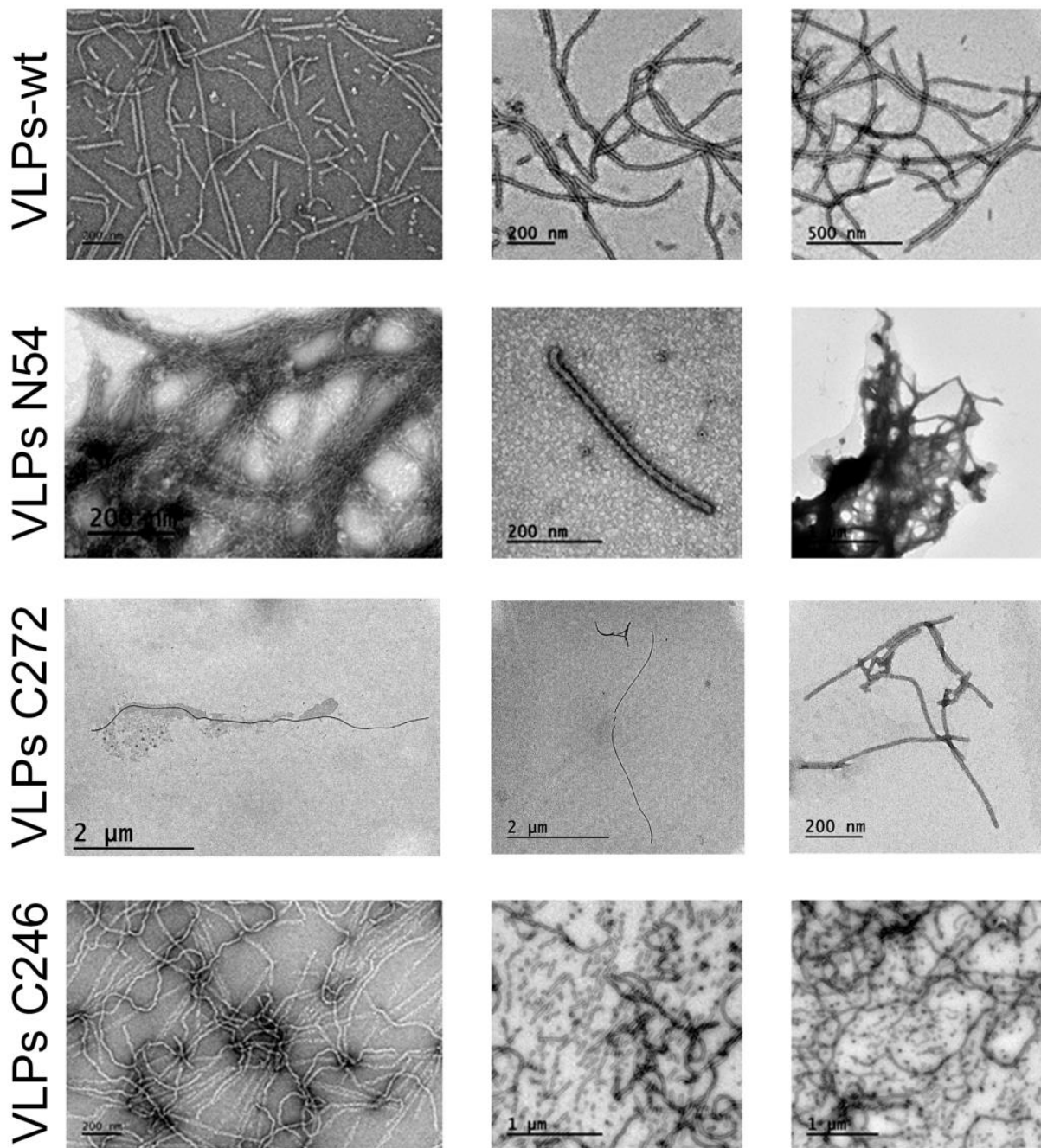


Figura 25. Micrografías de VLPs purificadas con la CP deletcionada y sin deletcionar.

Las nanopartículas carentes de gran parte del dominio N-terminal (N54) tienden a formar agregados de varias micras, visibles a simple vista e insolubles, que aparecen en las micrografías como intrincadas redes proteicas. Fue posible localizar alguna nanopartícula aislada, pero en una concentración extremadamente baja y con una longitud de entre 400 y 600 nm, algo inferior a la longitud habitual en VLPs-wt.

En cuanto al dominio C-terminal, las VLPs sin la región no resuelta en la estructura (C272) aparecen como nanopartículas de una longitud muy elevada, alcanzando más de 6 micras. Estas nanopartículas largas son quebradizas, como se refleja en la segunda imagen, donde aparece una nanopartícula muy larga segmentada en dos zonas. También aparecen nanopartículas similares a las VLPs-wt, con una longitud en torno a 700 nm.

Por último, las VLPs sin dominio C-terminal (C246) se muestran como nanopartículas con una longitud muy superior a la de las VLPs-wt, encontrándose nanopartículas de varias micras de longitud. Además, estas partículas son más flexuosas, con un diámetro similar al de las VLPs sin modificar. Con el transcurso del tiempo, estas nanopartículas se fragmentan en pequeños segmentos, siendo las VLPs largas menos abundantes. Son, por tanto, más quebradizas que aquellas que implican la delección de solo parte del dominio C-terminal.

4. Mutantes en forma de virión

Debido a que las delecciones que implicaban al dominio N-terminal afectan de manera considerable al ensamblado, y por la evidencia bibliográfica de su implicación en la infectividad (Kimalov y col., 2004; Voloudakis y col., 2005), únicamente se realizaron las construcciones que implican al dominio C-terminal (C272 y C246) en forma de plásmido infeccioso. Para ello se empleó una construcción del aislado UK1 que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) entre las proteínas P1 y HC-Pro, de forma que la infección no solo se puede evaluar mediante sintomatología o técnicas inmunológicas, sino también mediante iluminación con luz ultravioleta de las hojas infectadas. Los síntomas que se desarrollan en *N. benthamiana* por infección con el aislado UK1 de TuMV se presentan en la Figura 26, y consisten en una detención del crecimiento, rugosidad de las hojas y aparición de regiones cloróticas.

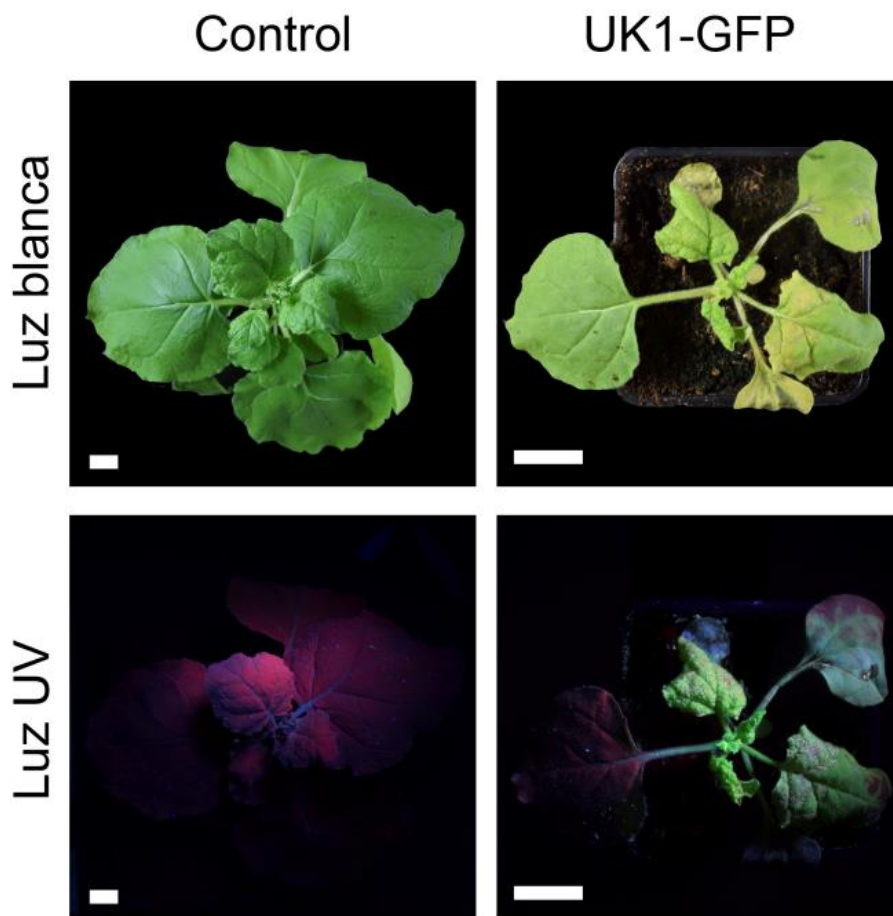


Figura 26. Infección de *Nicotiana benthamiana* por el aislado UK1 con GFP. Barra de escala correspondiente a 2 cm.

Una vez obtenidas las construcciones se inocularon ejemplares de *Nicotiana benthamiana*, realizando el seguimiento de las mismas durante 21 días. Una vez transcurrido este tiempo, se evaluó la sintomatología obtenida, así como la aparición de fluorescencia.

En cuanto al desarrollo de síntomas, el estado de las plantas inoculadas tras 21 días se presenta en la Figura 27, donde se observa que únicamente el aislado UK1 con GFP sin modificar da lugar a los síntomas descritos.

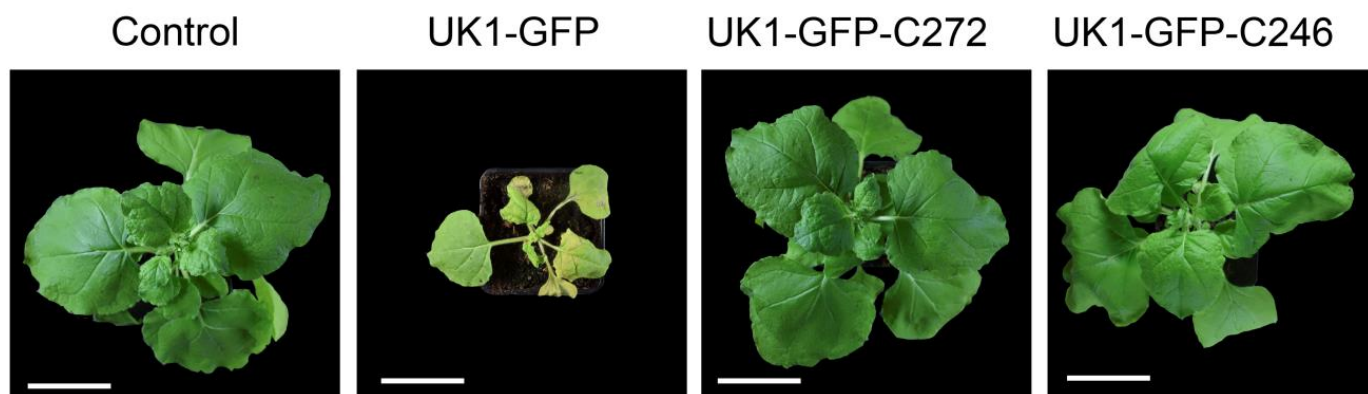


Figura 27. Sintomatología desarrollada en ejemplares de *Nicotiana benthamiana* inoculados con las distintas construcciones. Barra de escala correspondiente a 2 cm.

Para determinar si la ausencia de síntomas se debía a la incapacidad infecciosa de los mutantes o a implicaciones relativas al movimiento a larga distancia para obtener una infección sistémica, se evaluó la emisión de fluorescencia en las hojas inoculadas, así como en las hojas más jóvenes de los ejemplares inoculados, mostrados en la Figura 28.

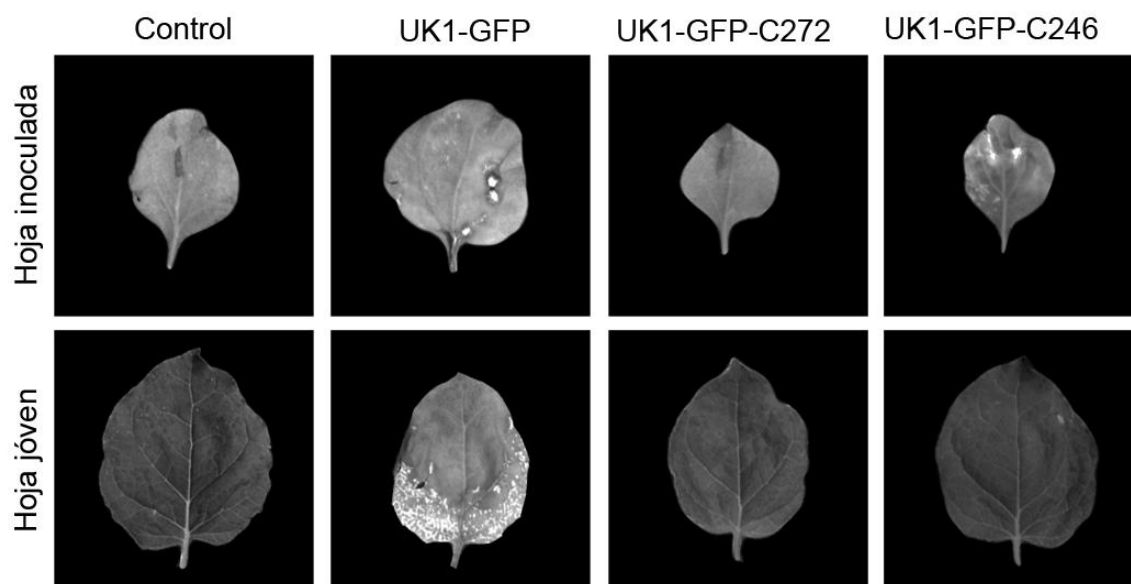


Figura 28. Análisis de la fluorescencia presente en hojas inoculadas y jóvenes de las plantas inoculadas con las distintas construcciones.

La aparición de cierta fluorescencia basal, la cual se puede apreciar en la hoja inoculada de la planta control, sometida al mismo proceso de inoculación empleando únicamente tampón, se asocia a la autofluorescencia del carborundo, el cual se

emplea para inducir microlesiones en el proceso de inoculación. Esta autofluorescencia descartaría la emisión de fluorescencia atribuida a la expresión de GFP tanto en la construcción control como en la delección C272. En la hoja inoculada con UK1-GFP se aprecian lesiones locales fluorescentes muy intensas, y otras con menor intensidad, donde se ha producido infección. Lesiones similares aparecen en la delección C246, algunas de ellas asociadas a lesiones necróticas. En cuanto a las hojas jóvenes, la aparición de fluorescencia indicaría una infección sistémica. Ésta únicamente aparece en el caso de la construcción del aislado UK1 fluorescente sin modificar.

Se realizaron varios experimentos de inoculación, encontrándose lesiones fluorescentes en hojas inoculadas en aproximadamente un 15% de los ejemplares inoculados con la delección C246 y ninguno en la C272. Se realizaron inmunoensayos de ELISA e inmunocaptura, pero no se obtuvo en ninguno de los casos respuesta positiva para ambos mutantes. Esto podría indicar que, aunque existe movimiento entre células, éste tiene una eficacia muy baja, lo que implica una mínima acumulación, indetectable mediante las técnicas habituales. Según estos resultados, el dominio C-terminal resultaría imprescindible para lograr una infección sistémica, aunque no para el movimiento célula-célula, si bien es cierto que con un menor nivel de eficacia.

DISCUSIÓN

Gracias al desarrollo de un modelo estructural, y en base a estudios previos en virus de morfología similar, se decidió generar distintos mutantes en los que se delecionaron regiones de la proteína de la cápsida viral.

En lo referente a los mutantes realizados en viriones, para intentar comprender mejor la implicación de las delecciones en el movimiento viral, es importante tener en cuenta el proceso infeccioso. Este proceso comienza con la infección del virus en una célula, donde se produce todo el proceso de replicación necesario para generar nuevos viriones y así poder infectar a las células adyacentes. Este proceso implica, por tanto, un movimiento a corta distancia célula-célula. Una vez el área de infección se extiende lo suficiente como para alcanzar un vaso de la hoja, el virus puede viajar a través de él a larga distancia, alcanzando regiones de la planta más apicales. A este proceso en el que se alcanzan otros tejidos de la planta se le denomina movimiento a larga distancia. De acuerdo con esto, los resultados obtenidos indicarían que la delección total o parcial del dominio C-terminal impide el proceso de infección sistémica, mediante la inhibición del movimiento a larga distancia, aunque sí parece existir cierto nivel de movimiento célula a célula en la delección que implica el dominio C-terminal completo.

Ya considerando los resultados obtenidos en VLPs, los notables cambios estructurales que se pueden observar en la Figura 25 dan lugar a numerosas conclusiones, que podrían ser relevantes a la hora de diseñar nanopartículas virales con aplicaciones específicas.

Con este trabajo se pone de manifiesto la posibilidad de producir nanopartículas de TuMV con la CP delecionada mediante VLPs, pero no en forma de viriones, si bien es cierto que no se ha determinado si la infectividad sistémica podría restaurarse añadiendo nuevas secuencias externas, es decir, sustituyendo la secuencia de aminoácidos delecionada por una escogida minuciosamente para tener una aplicación específica, pero compensando la región ausente en composición de aminoácidos, carga y tamaño. En este caso, habría que tener en cuenta la dificultad a la hora de escoger un péptido con las mismas características estructurales y de composición para obtener estas partículas infectivas. En cualquier caso, los resultados obtenidos con VLPs permitirían el diseño de partículas con características nuevas.

Las VLPs con parte del dominio N-terminal deletado tienden a agregar, formando una intrincada red proteica. Es posible que al escindir parte del dominio externo de la CP estemos eliminando regiones que actúan como "espaciadores", de manera que con su ausencia podrían establecerse nuevas interacciones laterales entre las nanopartículas individuales. Estas nanopartículas podrían emplearse en aplicaciones en las que fuese necesario un gran acúmulo proteico, teniendo un comportamiento similar al obtenido añadiendo glutaraldehído a las nanopartículas virales (Cuenca y col., 2016). El comportamiento de estas nanopartículas mutadas abriría las puertas a aplicaciones específicas, por ejemplo, para la inmovilización de enzimas u otras proteínas cuya actividad dependa de una alta concentración localizada.

Las VLPs con la delección C272 plantean interpretaciones desde distintos puntos de vista. Como ya se ha mencionado anteriormente, hasta la publicación de la estructura de WMV se proponía que la región implicada en esta delección se encontraba en la superficie del virión (Shukla y col., 1988; Shukla y col., 1994; Zamora y col., 2017). Con la criome se ha podido determinar que en realidad gran parte del dominio C-terminal se encuentra en el interior del virión, actuando como un andamio o armazón para la estructura. Centrándonos en la región no resuelta en la estructura, y por tanto la que afecta directamente a esta delección, hemos podido determinar que el aminoácido inmediatamente anterior a la delección se encuentra en el interior del poro, justo en la confluencia de tres subunidades, dos pasos de vuelta por encima de la subunidad a la que pertenece, siendo la zona que presenta mayor apertura (Figura 23). Teniendo en cuenta este análisis y los resultados de tripsinización (Shukla y col., 1988), la nueva hipótesis que se plantea es que, de alguna manera, la región desordenada es capaz de cruzar esta apertura formada entre tres subunidades y exponerse al exterior, donde sería susceptible a la tripsinización. Sin embargo, ya que en teoría la digestión se produce hasta parte de la región interna del poro (aminoácido 275, implicando tres de los aminoácidos localizados en la región interna del virión), aún habría que realizar estudios para una evaluación en profundidad. Con estos resultados queda patente que los nuevos conocimientos estructurales obtenidos mediante criomicroscopía electrónica han permitido un mejor conocimiento de estos virus, pero las limitaciones de esta técnica aún dejan interrogantes abiertos en lo referente a las regiones intrínsecamente desordenadas que no han podido localizarse en un punto concreto.

En las partículas ensambladas de la delección C272, la estructura en sí no se ve modificada, manteniendo el diámetro y en la mayoría de los casos la longitud de las nanopartículas sin modificar. Destaca la presencia de VLPs extremadamente largas, superando las 6 micras, casi 10 veces la longitud del virión. Es cierto que estas nanopartículas aparecen en algunos casos fragmentadas, pero la aparición de fragmentos de menor tamaño también está presente en las VLPs-wt. Por lo tanto, salvo por las nanopartículas inusualmente largas, el resto de características se mantiene sin cambios importantes respecto de las VLPs sin deleccionar.

Si tenemos en cuenta el mantenimiento estructural de estas VLPs, donde se mantienen la flexuosidad, longitud y diámetro, además de presentar estabilidad similar a las VLPs-wt, se plantea una nueva aplicación para estas nanopartículas. Las VLPs delecionadas en el dominio C-terminal podrían emplearse en casos de fusión genética de péptidos cuya actividad requiera la exposición del dominio C-terminal, ya que hasta el momento las aplicaciones de fusión genética siempre se han realizado en el dominio N-terminal (González-Gamboa y col., 2017; Sánchez y col., 2013). Además, esta nueva posibilidad de fusionar péptidos en el dominio C-terminal, nunca explotada anteriormente, permitiría un nuevo sistema de multifuncionalización genética, donde se plantea la posibilidad de modificar la proteína de la cápsida con un péptido fusionado en cada dominio, si bien es cierto que las posibles interacciones que se generen en estos nuevos fragmentos serían un importante factor a considerar.

Por último, las VLPs de la delección que implica el dominio C-terminal completo (C246) son las que muestran mayores diferencias respecto de las VLPs-wt. De nuevo estas nanopartículas son inusualmente largas, alcanzando longitudes de varias micras con un mayor nivel de flexuosidad. Esta flexuosidad podría ir ligada a una estructura mucho más flexible y sinuosa, pero la aparición, transcurridas unas semanas, de numerosos fragmentos de pequeña longitud que acompañan a un menor número de nanopartículas largas parece desechar esta hipótesis. Teniendo en cuenta que la región diferencial de la delección C246 respecto de la C272 es aquella que se encuentra en el interior del virión, formando la pared del poro interno de la estructura, la ausencia de este "andamio" o soporte estructural podría implicar pérdida de estabilidad. De acuerdo a esta hipótesis, las subunidades serían capaces de interactuar generando partículas alargadas, pero éstas presentan una mayor tendencia a fragmentarse en pequeñas secciones de menos de 100 nm.

Considerando las características estructurales específicas de estas nanopartículas con todo el dominio C-terminal deleccionado se pueden plantear

nuevas aplicaciones para las nanopartículas de TuMV. Ya que las VLPs se forman, la posibilidad de funcionalizarlas sigue presente. Además, el hecho de que, transcurrido un tiempo, las nanopartículas se fragmenten, plantea una nueva funcionalidad: su uso en aplicaciones que no requieran una gran estabilidad a largo plazo. Este es el caso, por ejemplo, de vehiculización de fármacos. Se podrían diseñar nanopartículas con fármacos que además sean capaces de dirigirse a un tejido concreto por presentar un ligando o un marcador específico. Una vez allí, su fragmentación liberaría el fármaco en cuestión, de forma localizada.

Con todos estos resultados se pone de manifiesto que la modificación de nanopartículas virales mediante fusión genética no se limita únicamente a la fusión de péptidos en el N-terminal de la CP, sino que un estudio estructural más detallado y el desarrollo de diferentes mutantes debería permitir el diseño de nanopartículas hechas a medida para según qué aplicación.

Las VNPs de TuMV aparecen de nuevo como una alternativa muy versátil para el desarrollo de herramientas biotecnológicas aplicables a numerosos campos, desde procesos industriales, pasando por control de patógenos o tratamientos biomédicos.

CAPÍTULO 3

MULTIFUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS VIRALES DE T_uMV BASADA EN SU ESTRUCTURA

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha producido un crecimiento sustancial en el desarrollo de nanomateriales para aplicaciones muy diversas, por lo que la investigación en el campo se está enfocando considerablemente en la posibilidad de multifuncionalizar estos nanomateriales. Para esta funcionalización, el empleo de reacciones químicas dirigidas, empleando conectores de distinta naturaleza y tamaño, se ha convertido en tendencia. La mayor parte de los intentos de multifuncionalización se han realizado en nanopartículas inorgánicas, que a menudo requieren conectores distintos para cada funcionalización (uno por derivatización), o el uso de un solo conector para conjugar diferentes compuestos mediante la misma reacción química, un enfoque en el que el difícil control de las diferentes derivatizaciones se convierte en una desventaja (Seleci y col., 2016; Trabulo y col., 2017). Es importante, además, tener en cuenta que el uso de partículas inorgánicas implica ciertas limitaciones relacionadas con la toxicidad y la biodegradabilidad, que se pueden resolver con el uso de biopartículas (Chen y col., 2018; Fakruddin y col., 2012).

Centrándonos en las bionanopartículas, las nanopartículas proteicas (PBN) resultan interesantes al ser biodegradables y porque la producción de proteínas de fusión está ampliamente extendida, existiendo numerosas posibilidades para la expresión de las mismas en distintas plataformas como microorganismos o plantas (Uhlén y col., 1992). Además, en nanopartículas proteicas la gran variedad de grupos funcionales que aportan los diferentes aminoácidos va a proporcionar numerosas posibilidades para la modificación de su superficie mediante uniones covalentes a estos residuos (de Pinho Favaro y col., 2018; Tarhini y col., 2017).

Dentro de las PBNs, las nanopartículas virales (VNPs) van tomando protagonismo como alternativa en biotecnología. Estas nanopartículas presentan un gran potencial para la funcionalización, ya sea a través de las mencionadas proteínas de fusión (modificación genética) o mediante la conjugación química a sus distintos aminoácidos. Además, las nanopartículas virales presentan una característica que las hace especialmente atractivas, la posibilidad de obtener nanopartículas no infecciosas conocidas como partículas tipo virus (VLPs), que mantienen la estructura del virus (cápsida viral) sin la presencia de ácidos nucleicos gracias a la capacidad de autoensamblado de la proteína de la cápsida de los virus (Narayanan y Han, 2017; Pokorski y Steinmetz, 2011; Steinmetz y col., 2010; Yildiz y col., 2013). En este contexto, el uso de virus de plantas como VNPs está ganando amplia aceptación y desarrollo

debido a las ventajas adicionales de bioseguridad, bajos costos de producción y diversidad en forma, tamaño y naturaleza (Lico y col., 2015; Steele y col., 2017; Wen y col., 2013). En aplicaciones biotecnológicas, los virus con simetría helicoidal, flexuosa y alargada son particularmente interesantes por presentar un mayor número de proteínas de cápsida susceptibles de funcionalizar en cada nanopartícula (Alonso y col., 2013; Ausar y col., 2006; Nazzi y col., 2015). Las partículas de potyvirus contienen esta arquitectura flexuosa y alargada, con una longitud superior a la de otros virus con morfología similar y, por tanto, mayor número de CPs. Sorprendentemente, los miembros del género Potyvirus no han recibido una atención importante, y las publicaciones sobre ellos en este contexto son escasas (Fernández-Fernández y col., 1998; Jagadish y col., 1991; Kalnciema y col., 2012; Sánchez y col., 2013). Hasta ahora, los potyvirus únicamente se han modificado genéticamente para exponer epítomos en su superficie (González-Gamboa y col., 2017; Kalnciema y col., 2012; Sánchez y col., 2013) y no se han encontrado publicaciones referentes a la conjugación química en virus pertenecientes a este género.

Gracias al estudio estructural detallado en el Capítulo 1, así como estudios previos en otro potyvirus (Zamora y col., 2017) y otros análisis de homología de secuencias con miembros de este género, hemos podido estudiar la idoneidad de los distintos residuos aminoacídicos para ser derivatizados mediante conjugación química según su posición en el virión, su accesibilidad a la conjugación química o su abundancia. Los potyvirus exhiben una gran homología en la secuencia de aminoácidos de sus proteínas de cápsida, por lo que encontramos varias regiones conservadas, una de ellas el motivo **WCIEN**, ubicado en la región del genoma del potyvirus que codifica un segmento del dominio central de la CP (Zheng y col., 2008). Cada CP contiene este residuo de cisteína en la misma localización, probablemente jugando un papel en estabilidad estructural, y que podría ser utilizado para la conjugación química. En la abrumadora mayoría de las CP de potyvirus, la cisteína presente en el motivo **WCIEN** es la única en toda la proteína, como efectivamente ocurre en la CP de TuMV. Por otra parte, las mayores diferencias entre potyvirus se encuentran en la región N-terminal, donde independientemente de las diferencias en la secuencia siempre destaca la abundancia de residuos de lisina. Es por ello que las lisinas también se presentan como objetivos potenciales para la funcionalización química. En el caso particular de TuMV, su CP tiene veintiuna lisinas, la mayoría de ellas presentes en el dominio N-terminal expuesto en la superficie, por lo que este residuo es un buen candidato para la derivatización múltiple con más de 2000 copias del compuesto conjugado.

Por lo tanto, en el presente capítulo se intenta emplear los residuos de cisteína y lisina presentes en la cápsida viral para la derivatización química. También se busca la capacidad de conjugar simultáneamente diferentes moléculas a estos residuos, seleccionando distintos compuestos y reacciones químicas para cada residuo, obteniendo VNPs multiderivatizadas. Nuestro objetivo es mostrar el potencial de las partículas de TuMV para la funcionalización química utilizando sus residuos naturales, que junto con la fusión genética deberían permitir la funcionalización múltiple de VNPs. Este enfoque tiene el potencial de mejorar las propiedades de las VNPs y adaptarlas buscando el diseño de herramientas muy específicas en diferentes campos de investigación.

RESULTADOS

1. Estrategias de funcionalización basadas en la estructura de TuMV

Se realizó un alineamiento de cuarenta y nueve secuencias de diferentes especies del género potyvirus (material suplementario) para localizar regiones conservadas, así como la presencia de cisteínas. El motivo WC^{CI}EN, localizado en la región central de la proteína de la cápsida (CP), es uno de los motivos más conservados, apareciendo la cisteína de ese motivo en todos los potyvirus estudiados, siendo la única cisteína de la CP en la mayoría de los casos. Intrigados por la presencia de una única cisteína en toda la CP, decidimos estudiar su papel en el ensamblado del virión y determinar su reactividad para posibles conjugaciones.

En primer lugar, nuestro objetivo fue evaluar el papel de la cisteína en el proceso de ensamblado. Para ello diseñamos VLPs con una mutación puntual en la CP, reemplazando la cisteína por una serina (C140S en TuMV). Una vez confirmada su producción, las partículas se purificaron y visualizaron mediante TEM. Observamos partículas alargadas y flexibles, similares a las de las VLPs sin modificar (Figura 29), lo que indica que la cisteína probablemente no esté jugando un papel relevante en el ensamblado de la cápsida, por lo que podría ser accesible y reactiva para los procesos de conjugación.

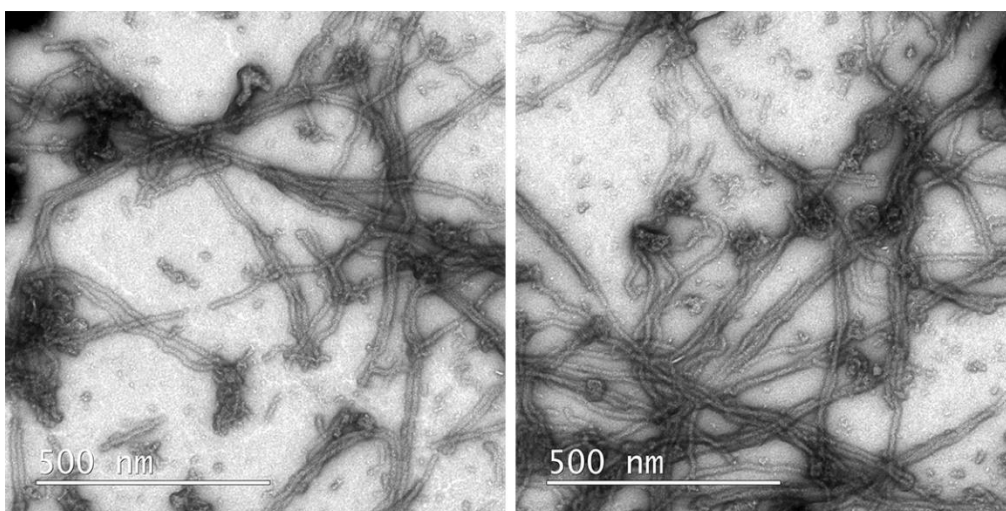


Figura 29. Micrografías de VLPs de TuMV con mutación puntual C140S.

Comparándolo con la única cisteína, se consideraron el alto número de residuos de lisina (veintiún en TuMV) y su prevalencia en diferentes miembros del género potyvirus como una buena oportunidad para funcionalizar VNPs con un mayor número de moléculas, superando las aproximadamente 2000 por partícula obtenidas por fusión genética (González-Gamboa y col., 2017; Sánchez y col., 2013). Este residuo se ha utilizado en otros virus para la conjugación química, debido a su capacidad de crear enlaces amida muy estables en condiciones fisiológicas con ciertos grupos químicos, y también por tratarse de un residuo muy abundante y generalmente expuesto al solvente. Estas características hacen de la lisina un buen candidato para la derivatización de partículas virales en su superficie.

Gracias a la estructura de TuMV obtenida por criomicroscopía electrónica o por modelado (Capítulo 1) se pudieron situar la cisteína y las lisinas en la CP como monómero, así como en la superficie de la partícula ensamblada (Figura 30). Las imágenes que se muestran en el presente capítulo son las correspondientes al modelo, sobre el cual se basó el diseño experimental de la conjugación, si bien es cierto que las diferencias con la criomicroscopía electrónica son mínimas. Es importante considerar la ausencia en la estructura de los aminoácidos 1-65, correspondientes a parte del dominio N-terminal (doce de ellos lisinas, ninguno cisteína), y 272-288, los últimos dieciséis aminoácidos del dominio C-terminal (ninguno lisina o cisteína), debido a que no hay densidad atribuible a estas regiones, presumiblemente debido a su flexibilidad. La estructura mostró que el residuo de cisteína se encuentra dentro de la región central de la CP y, por tanto, no está expuesto en la superficie, mientras que las lisinas se distribuyen a lo largo de la CP (principalmente en la región N-terminal), excepto en el dominio C-terminal (ubicado en el interior de la VNP). Un gran número de lisinas (quince residuos) se encuentran teóricamente expuestas en la superficie de la VNP (doce de ellas en la región no resuelta) y, por lo tanto, son más accesibles a los solventes que el residuo de cisteína.

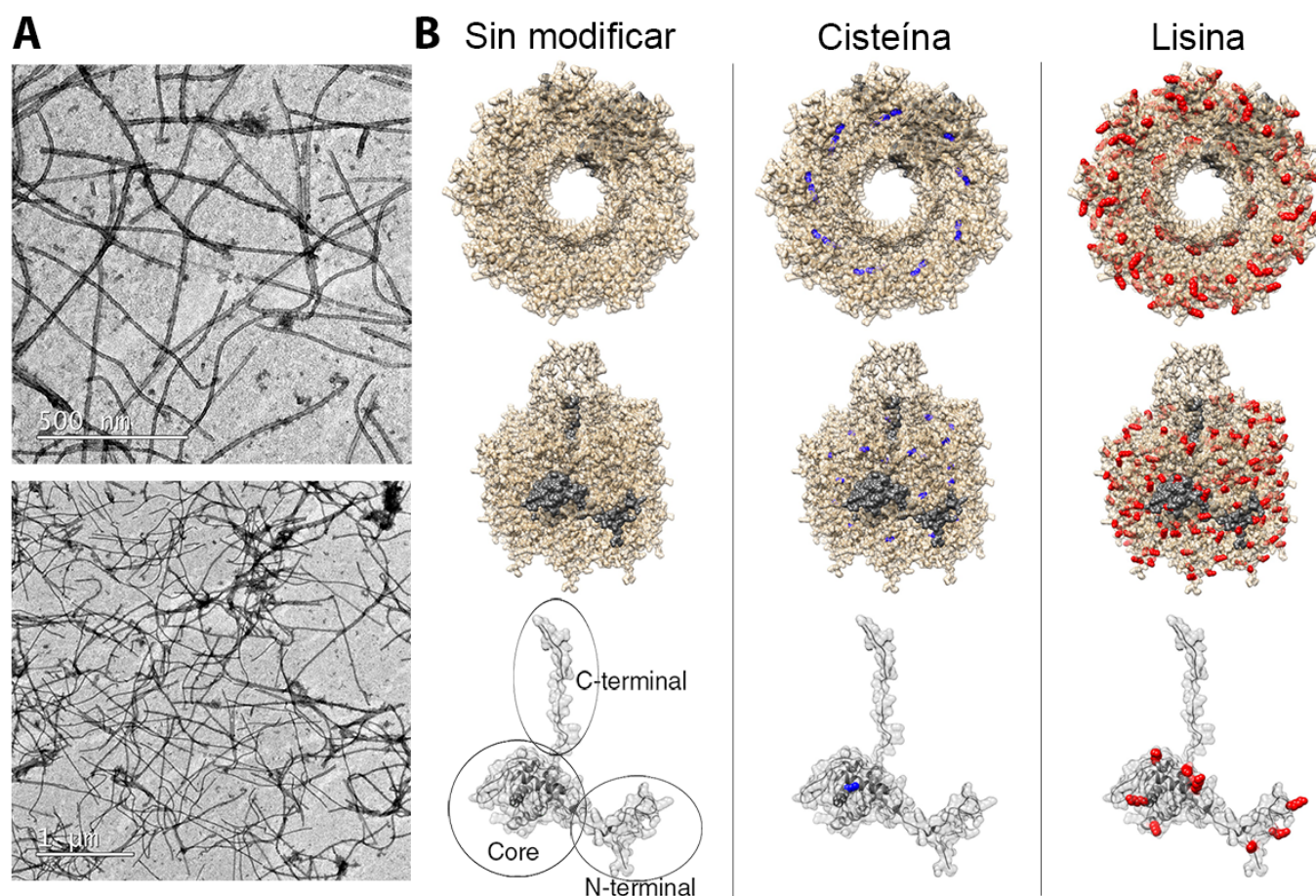


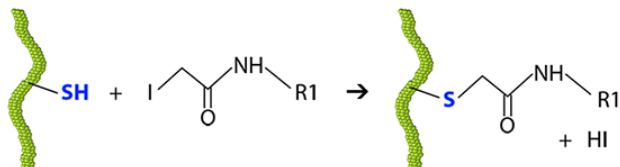
Figura 30. Estructura de TuMV y localización de los residuos de cisteína y lisina. A. Imágenes de TEM de partículas sin modificar en forma de virión (panel superior) y VLP (panel inferior). B. Estructura de TuMV. Dos representaciones de partículas ensambladas (3 vueltas, monómero en gris) y una del monómero de la CP (panel inferior). La representación del monómero permite distinguir la región central o core y los dominios N- y C-terminales. Estas representaciones se repiten marcando el residuo de cisteína (azul) y las lisinas (rojo), tres de ellas en la región representada del dominio N-terminal (Lys69, Lys74 y Lys82, otras doce no visibles) y expuestas en la superficie de la VNP.

Basándonos en estos estudios estructurales, se consideraron ambos residuos para las estrategias de funcionalización química: cisteína para la conjugación interna de moléculas pequeñas y lisinas para el recubrimiento de la superficie con compuestos más grandes, incluyendo macromoléculas como péptidos y proteínas.

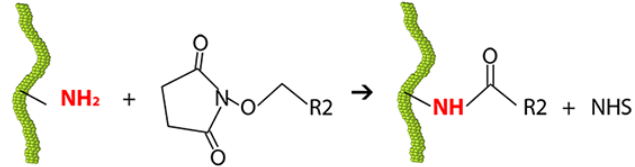
Para obtener partículas multifuncionales, se abordó la conjugación a cisteína y lisinas usando dos grupos reactivos diferentes: iodoacetamido para la conjugación a cisteína y grupo NHS-éster para la conjugación a lisinas. Para la conjugación a cisteína, el iodoacetilo reacciona con los sulfhidrilos libres por sustitución nucleofílica del yodo en el grupo tiol de la cisteína, dando como resultado un enlace tioéter estable. En el caso de lisinas, el NHS-éster a pH 7,0 - 8,5 hidroliza los grupos amino no protonados, creando

enlaces amida muy estables y liberando NHS. Además, la fusión genética de un péptido proporcionó una funcionalización adicional, por lo que uniendo todas las estrategias obtuvimos tres vías diferentes para funcionalizar cada partícula (Figura 31).

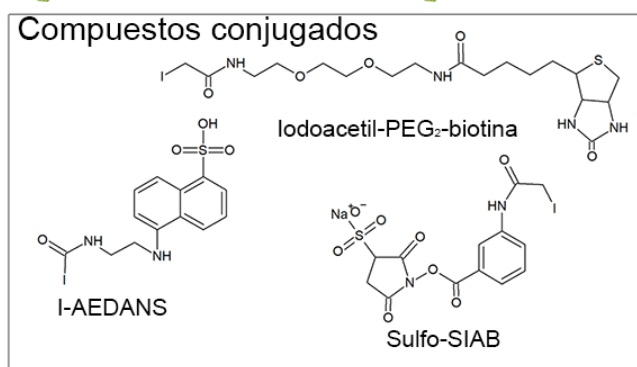
Reacción Sulfhidrido-iodoacetamido



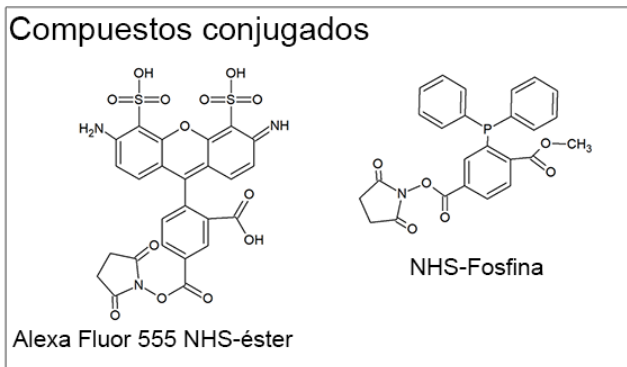
Reacción Amina-NHS-éster



Compuestos conjugados



Compuestos conjugados



Fusión genética

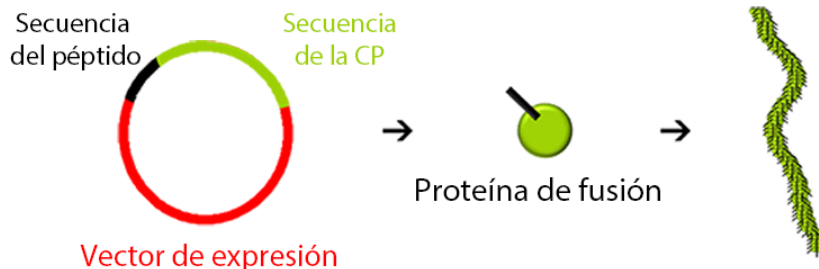


Figura 31. Estrategias de funcionalización. En la parte superior izquierda, conjugación química entre el sulfhidrido (presente en la cisteína) y el iodoacetamido (presente en diferentes compuestos a conjugar). Los diferentes compuestos fueron I-AEDANS (compuesto fluorescente), Iodoacetyl-PEG₂-Biotina (para inmunoensayos) y Sulfo-SIAB (conector heterobifuncional entre la CP y otros compuestos con grupo amino). En la parte superior derecha, conjugación química entre un amino (presente en las lisinas y el extremo N-terminal de la CP) y el NHS-éster (presente en diferentes compuestos a conjugar). En este caso, los compuestos unidos fueron Alexa Fluor 555 NHS éster (compuesto fluorescente) y NHS-Phosphine (conector entre aminas presentes en lisinas y otros compuestos con un grupo azido mediante la ligación de Staudinger). En la parte inferior, fusión genética de péptidos.

2. Caracterización de las nanopartículas en distintos tampones y mantenimiento de la integridad a 37°C.

Ya que antes de abordar la conjugación a lisinas el tampón en el que siempre se ha trabajado con las nanopartículas de TuMV es Tris-HCl 10 mM + EDTA 10 mM pH 7,5, y debido a que este tampón contiene aminos libres que competirían con las lisinas en la reacción de conjugación, se decidió comprobar el comportamiento de las nanopartículas en diferentes tampones, procurando que además estos tampones fueran lo más similares posibles a condiciones fisiológicas de salinidad y pH. Los resultados se reflejan en la Figura 32.

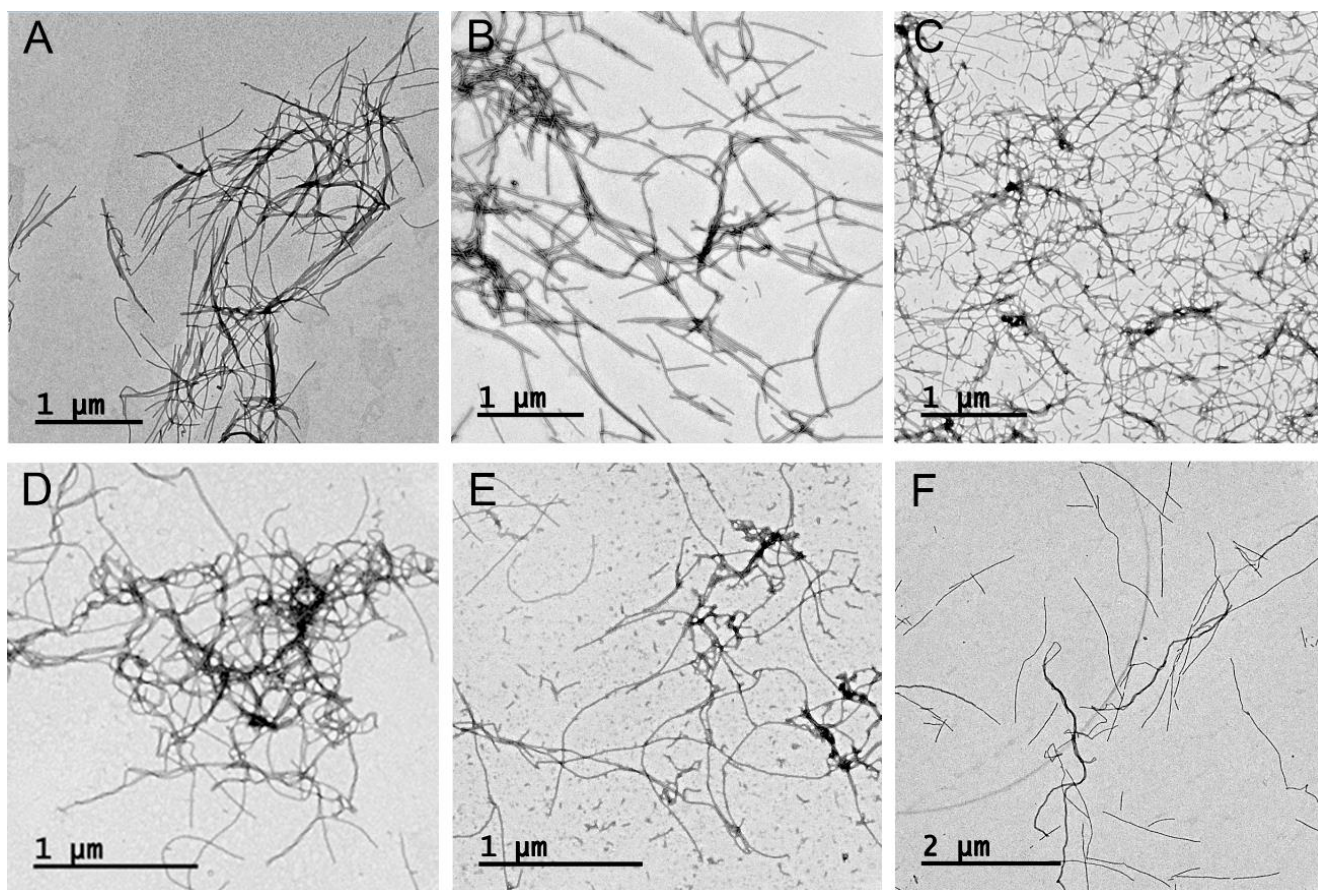


Figura 32. Estabilidad estructural de VNPs de TuMV en diferentes tampones a distintos pHs. A. Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. B. MOPS 20 mM, pH 7,0. C. HEPES 10 mM, pH 7,5. D. Fosfato 20 mM, pH 7,5. E. Borato 20 mM, pH 8,1. F. Carbonato 10 mM, pH 8,6. Los resultados mostrados en las micrografías son con viriones, siendo los resultados con VLPs muy similares.

Por otro lado, también para determinar que las condiciones fisiológicas de temperatura no afectan a la estabilidad estructural del virus, se realizaron ensayos a

37°C durante una y dos horas, en base a los resultados previos ya obtenidos a 28°C en VLPs (González-Gamboa y col., 2017). Los resultados se muestran en la Figura 33.

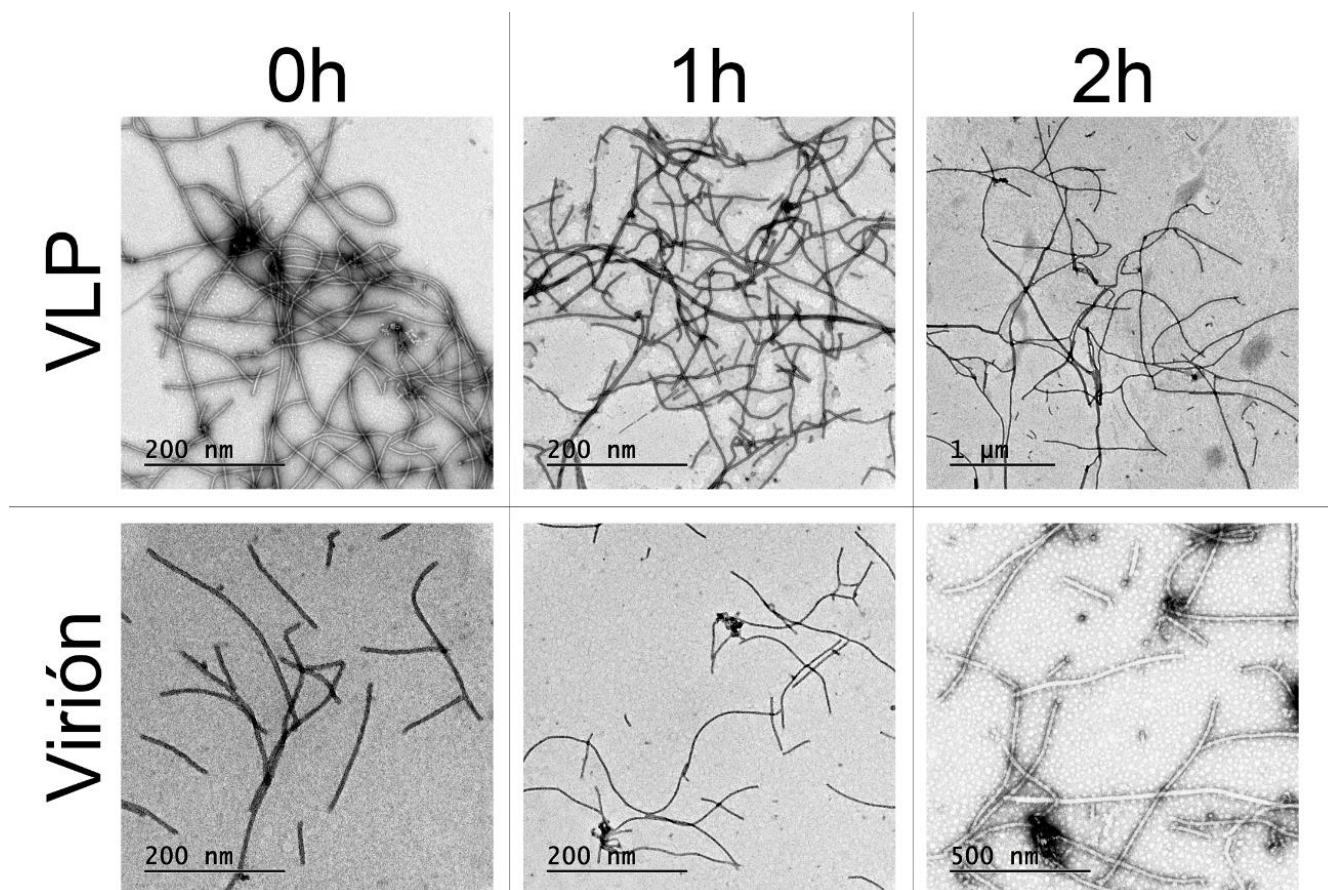


Figura 33. Estabilidad estructural de VNPs de TuMV a 37°C. En ambos casos, VLP y virión, el tratamiento térmico no afecta al ensamblado. Una pequeña cantidad de partículas (<10%) presentan una longitud menor, probablemente debido a que el incremento de la temperatura induce cierto nivel de fragmentación.

3. Derivatización de la región interna de la VNP por conjugación a cisteína

Se utilizaron tres compuestos para probar la posibilidad de derivatización química del residuo de cisteína con moléculas de diferente tamaño y naturaleza: un compuesto fluorescente (I-AEDANS), un compuesto biotinilado (EZ-Link™ iodoacetyl-PEG₂-biotina) y un conector bifuncional para la conjugación posterior de péptidos o macromoléculas con aminas libres (Sulfo-SIAB).

El compuesto fluorescente, I-AEDANS, se utilizó para determinar si la cisteína de TuMV tenía su grupo sulfhidrilo accesible. La alquilación de la proteína se visualizó mediante iluminación UV de un gel SDS-PAGE antes de la tinción con Instant Blue (Figura 34 A). Después de la incubación, era evidente que las muestras de TuMV (viriones y VLPs), así como el control positivo (BSA, treinta y cinco residuos de cisteína) habían reaccionado con I-AEDANS. Pudimos observar mediante iluminación UV del gel la banda de 33 kDa correspondiente a la CP de TuMV. Sin embargo, el tobamovirus (el virus del moteado suave del pimiento, PMMV) que también tiene una cisteína, pero no reactiva (McCormick y Palmer, 2008), no se conjugó con I-AEDANS, por lo que no mostró una banda en la posición esperada de 17 kDa.

Después de demostrar que la cisteína era accesible a la conjugación química, utilizamos un compuesto biotinilado (EZ-Link™ iodoacetil-PEG₂-biotina) detectable en inmunoensayos con anticuerpo antibiotina. Las VNPs conjugadas se caracterizaron en primer lugar por SDS-PAGE y WB con anticuerpos antipotv y antibiotina (Figura 34 B). Como cabía esperar, los resultados de la SDS-PAGE mostraron una banda de 33 kDa, correspondiente a la CP del TuMV tanto en la muestra sin conjugar como en la CP conjugada con el compuesto biotinilado. El WB expuesto a anticuerpo antipotv mostró una banda tanto en la CP conjugada como sin conjugar, lo que indica que la conjugación del conector de biotina no interfirió con el reconocimiento del virus por un anticuerpo monoclonal de potyvirus. Asimismo, se realizó un WB con anticuerpo antibiotina, que mostró una banda en la muestra conjugada (CP biotinilada) con un peso molecular de ~ 33 kDa y ninguna banda donde no se realizó la conjugación, evidenciando una conjugación.

Otro aspecto importante de la estrategia de conjugación fue el mantenimiento de la integridad de las partículas de TuMV. Para evaluar la estructura de las nanopartículas conjugadas, se utilizó microscopía electrónica de transmisión. Las imágenes de TEM mostraron que la forma filamentosa de las partículas de TuMV permaneció intacta después de la conjugación (Figura 34 C). La arquitectura general de las partículas biotiniladas conservaba las características de un potyvirus, similar a las VNPs de TuMV sin modificar. También se realizó microscopía electrónica de inmunoabsorción, decorando las nanopartículas con anticuerpos antibiotina, donde se observaron partículas de biotina en la superficie de las nanopartículas.

Para comprobar las propiedades de las nanopartículas conjugadas con biotina se realizó un ELISA con placas tapizadas con VNPs de TuMV conjugadas con biotina y

biotina libre. La biotina se detectó usando diferentes diluciones de anticuerpo antibiotina (Figura 34 D).

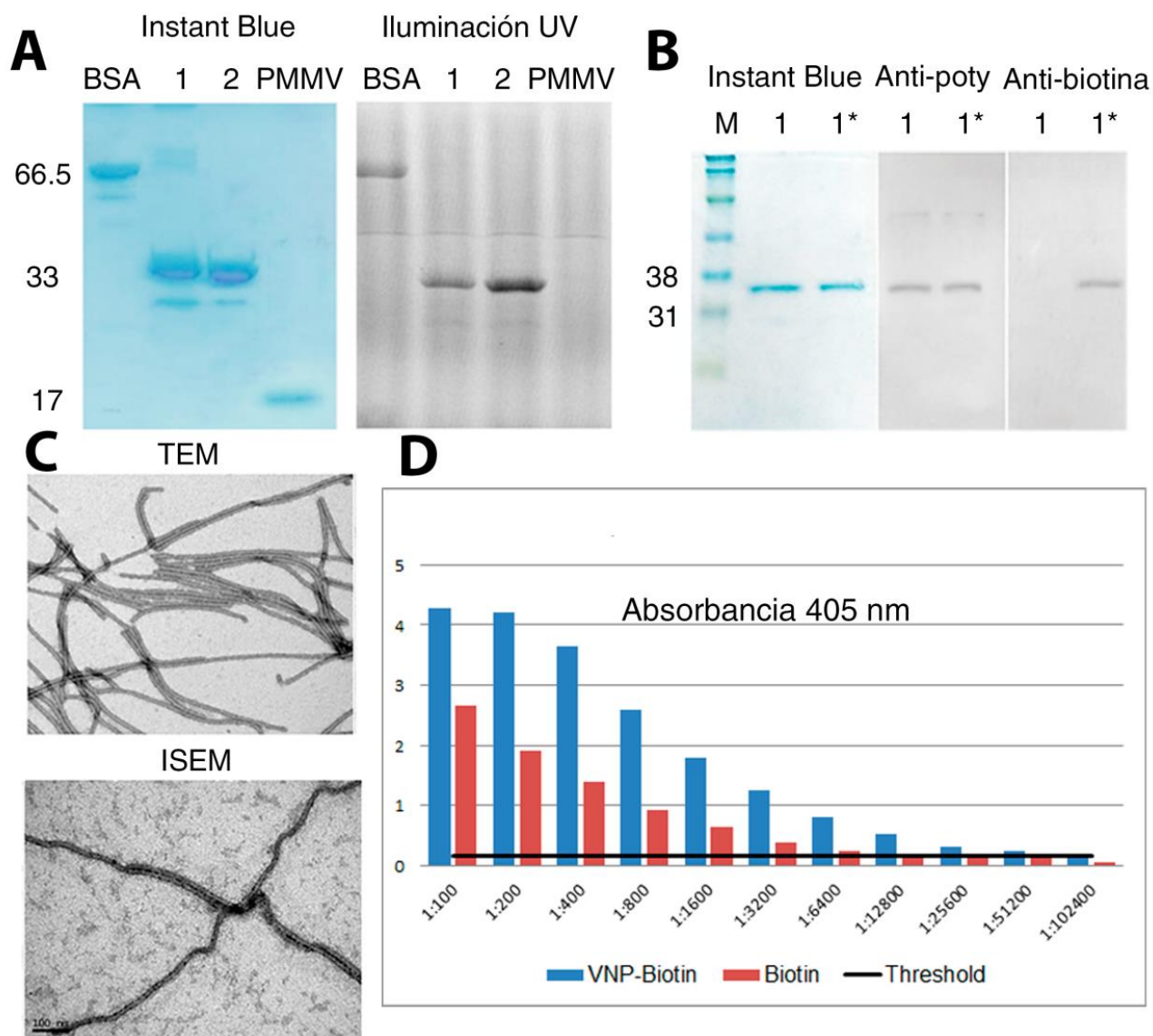


Figura 34. Derivatización química de cisteína. A. SDS-PAGE tratada con Instant Blue o iluminada con luz UV de viriones (1) y VLPs (2) conjugados con I-AEDANS. B. SDS-PAGE teñido con Instant Blue y WB de VNPs no conjugadas y conjugadas (*) con anticuerpos contra potyvirus (Antipoty) y biotina (Antibiotina). C. Microscopía electrónica sin (TEM) o con (ISEM) inmunodecoración de anticuerpos antibiotina. D. ELISA comparativo entre VNPs conjugadas con biotina y biotina libre leídos a 405 nm. La línea negra (umbral) representa el valor de A_{405} sobre el que la señal se considera positiva (tres veces más que el fondo).

Con el fin de funcionalizar VNPs con nuevas moléculas y proporcionarles un espectro más amplio de aplicaciones, decidimos intentar la conjugación de un péptido. Para la derivatización se escogió un conector heterobifuncional reactivo con aminas y sulfhidrilos: el Sulfo-SIAB. Los NHS-ésteres de este conector reaccionan con las

aminas primarias presentes en la cadena lateral de residuos de lisina y el extremo N-terminal de los péptidos, mientras que los iodoacetilos reaccionan con los sulfhidrilos libres presentes en la cadena lateral de la cisteína. Este conector se eligió debido a que tenía una química similar a la del compuesto biotinilado, ambos con un iodoacetilo, que funcionó correctamente en la conjugación anterior, por lo que esta química se mantuvo como estrategia de enlace.

Se seleccionó el péptido intestinal vasoactivo (VIP), un neuropéptido descrito como un potente factor antiinflamatorio y también relacionado con enfermedades autoinmunes (Delgado y col., 2002). Es un buen candidato teniendo en cuenta su composición de aminoácidos (HSDAVFTDNYTRLR**K**QMAV**KK**YLN**S**ILN), ya que presenta tres residuos de lisina en solo veintiocho aminoácidos (además de la amina primaria presente en el extremo N-terminal), favoreciendo la conjugación; y sin cisteínas que puedan interferir con el conector, pudiendo actuar como control de la eficacia y especificidad del conector. Su estructura también resulta atractiva, ya que consiste en una simple hélice con un tamaño óptimo para penetrar en el interior de la partícula ensamblada (Delgado y Ganea, 2013). Además, este es un péptido que ha sido problemático para expresar en la superficie de viriones o VLPs por un enfoque genético (resultados no mostrados), por lo que la funcionalización química parecía una vía para solventar estos problemas.

Para determinar el éxito de la conjugación hicimos ensayos de SDS-PAGE y WB (Figura 35 A). Los resultados correspondientes a las VNP conjugadas mostraron bandas con el peso molecular de la CP de 33 kDa en los dos casos: conjugación química (péptido y VNPs con conector) y control negativo (péptido y VNPs sin conector). En el WB se emplearon anticuerpos contra el virus y contra VIP. Todas las bandas reaccionaron con el anticuerpo antiTuMV, pero únicamente las muestras en las que estaba presente el conector fueron positivas para VIP. También se visualizaron varias bandas por encima de la banda de 33 kDa en el carril donde tuvo lugar la conjugación. Esto es coherente con el aumento del peso molecular después de la conjugación de uno, dos o tres péptidos VIP por CP.

Por último, las micrografías (Figura 35 B) mostraron que la conjugación con sulfo-SIAB daba lugar pequeños agregados o nanomallas.

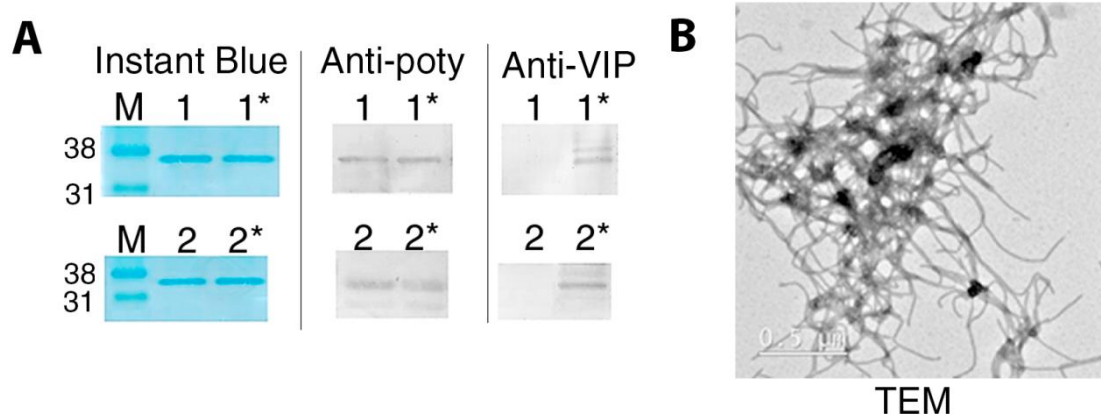


Figura 35. Derivatización química en la región interna de las nanopartículas con un péptido. A. SDS-PAGE y WB de viriones (1) y VLPs (2) conjugadas (*) y no conjugadas con péptido VIP a través de cisteína. B. Microscopía electrónica de transmisión de nanomallas creadas con la conjugación.

Para determinar la funcionalidad de estas nanopartículas como sistema de diagnóstico, se realizó un ELISA comparando la sensibilidad de las partículas conjugadas respecto al péptido libre, con una cantidad de péptido de 7 ng en cada uno de los tapizados (VIP como péptido libre, VIP conjugado a viriones y VIP conjugado a VLPs). Los resultados aparecen en la Figura 36.

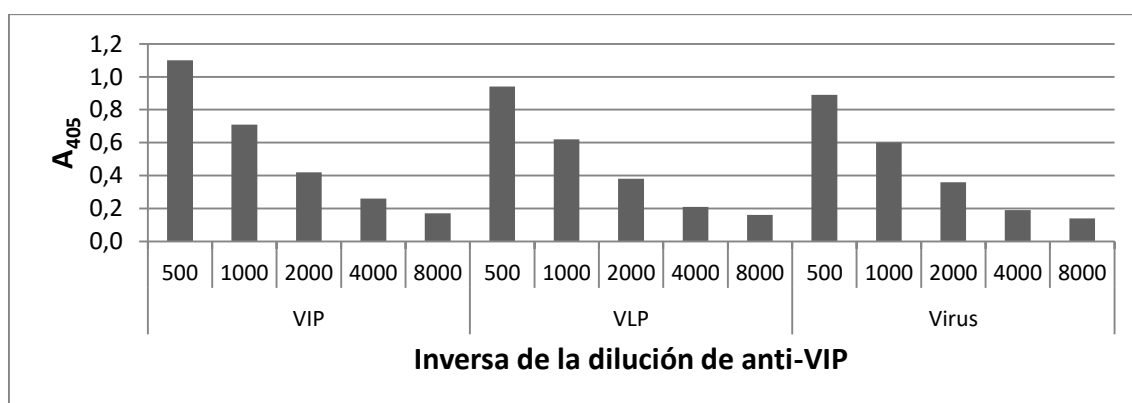


Figura 36. ELISA de sensibilidad de las VLPs conjugadas con VIP en la región interna. Se muestran los resultados obtenidos con los distintos tapizados (empleando cantidades equivalentes de péptido) con distintas diluciones del anticuerpo anti-VIP.

4. Derivatización de la superficie de las VLPs por conjugación a lisinas

Una vez demostrado que era factible una conjugación interna a través de la reacción cisteína-iodoacetilo, se intentó recubrir la superficie de las VLPs a través de la

conjugación a lisinas, localizadas principalmente en la superficie de la VNP. En este caso, el grupo elegido fue NHS-éster, que genera enlaces amida muy estables.

Para probar la funcionalidad de estos residuos para la conjugación, se utilizó un compuesto fluorescente: el Alexa Fluor 555 NHS éster (Kendall y col., 2015). La conjugación se demostró por iluminación UV de un gel de SDS-PAGE (Figura 38 A). Se intentó la conjugación tanto en viriones como en VLPs, obteniéndose resultados positivos en ambos casos.

Verificada la posibilidad de derivatizar los residuos de lisina, se probaron otras funcionalizaciones a través de este aminoácido. Se consideraron varios conectores y se decidió probar la ligación de Staudinger (Figura 37) con el conector fosfina-éster, capaz de crear enlaces amida estables en condiciones fisiológicas con cualquier compuesto que contenga una azida. En esta reacción, la trifenilfosfina reacciona con azidas para formar un iminofosforano intermedio junto con la liberación de nitrógeno gaseoso. Este compuesto intermedio inestable se descompone rápidamente en ambientes acuosos para producir óxido de trifenilfosfina y una amina primaria (Hermanson, 2013b).

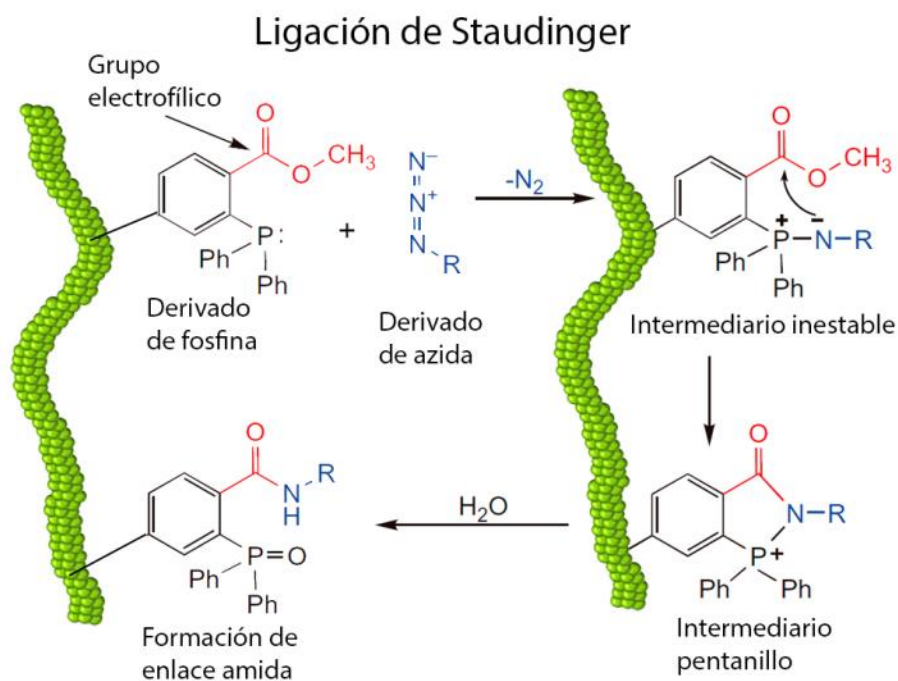


Figura 37. Ligación de Staudinger a VNPs de TuMV (Adaptado de Hermanson, 2013b).

Los primeros ensayos se realizaron con un compuesto azido fluorescente (Alexa Fluor™ 488 Azide), para seguir la reacción por fluorescencia de geles SDS-PAGE (Figura 38 B), y comprobar la estabilidad de la estructura del virión mediante TEM (Figura 38 C).

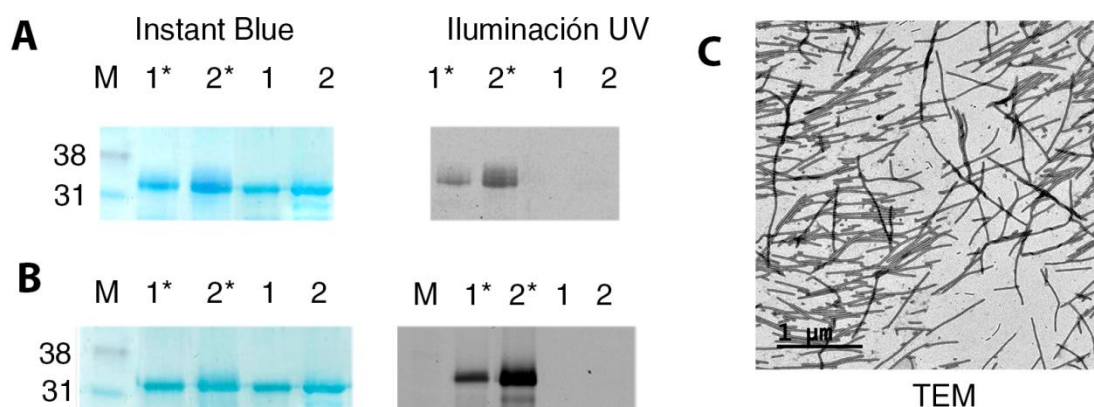


Figura 38. Derivatización química de lisina. A. Conjugación (*) a lisinas del compuesto fluorescente en viriones (1) y VLPs (2). B. Caracterización de la ligación de Staudinger con Alexa Fluor. Viriones (1) y VLPs (2) conjugados (*) con NHS-Fosfina y Alexa Fluor 488 Azida. SDS-PAGE Teñido con Coomassie e iluminación UV del mismo gel. C. TEM de VLPs conjugadas. M. Marcador de peso molecular (kDa).

Después de evaluar la eficacia de la ligación de Staudinger, se intentó conjugar el mismo péptido (VIP). El conector fue el mismo que el empleado en la conjugación indirecta del fluorocromo: NHS-fosfina, siendo la molécula de azida un ácido azidopentanoico insertado en el extremo N-terminal del péptido. Esto significa que la química fue exactamente la misma: la ligación de Staudinger.

Se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en cisteína en la conjugación a lisinas mediante ligación de Staudinger (Figura 39 A). En el WB con anticuerpo antipty se observó la banda de 33 kDa correspondiente a la CP sin conjugar, y en la muestra conjugada otras bandas adicionales correspondientes a diferentes cantidades de péptidos conjugados (de uno a cinco) por CP. Con anticuerpo antiVIP, la banda de 33 kDa no apareció marcada, y solo aparecieron las bandas correspondientes a la CP conjugada con moléculas de VIP.

Las micrografías (Figura 39 B) mostraron que la conjugación con ligación de Staudinger no generaba agregados, sino VLPs con las mismas características estructurales que las no modificadas.

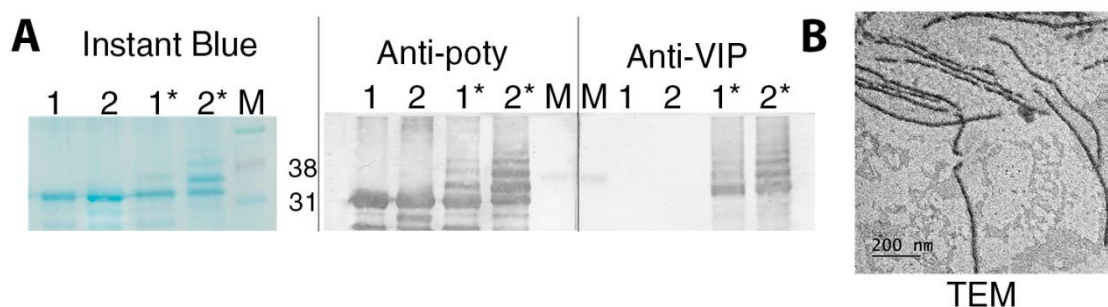


Figura 39. Derivatización por conjugación química en lisinas de un péptido en la superficie viral. A. Viriones (1) y VLPs (2) conjugados con NHS-Fosfina y péptido VIP (*) en comparación con VNPs no conjugadas. M: marcador de peso molecular (kDa), que muestra bandas correspondientes a 31 y 38 kDa. SDS-PAGE 12% teñido con Coomassie y WB usando anticuerpos anti-poty y antiVIP. B. TEM de VNPs conjugados.

De nuevo, para determinar la funcionalidad de las partículas como sistema de diagnóstico, se realizó un ELISA con las mismas características que el realizado en VNPs conjugadas en el interior, empleando 7 ng de péptido libre y la misma cantidad conjugada en VLPs o VNPs. Los resultados aparecen en la Figura 40.

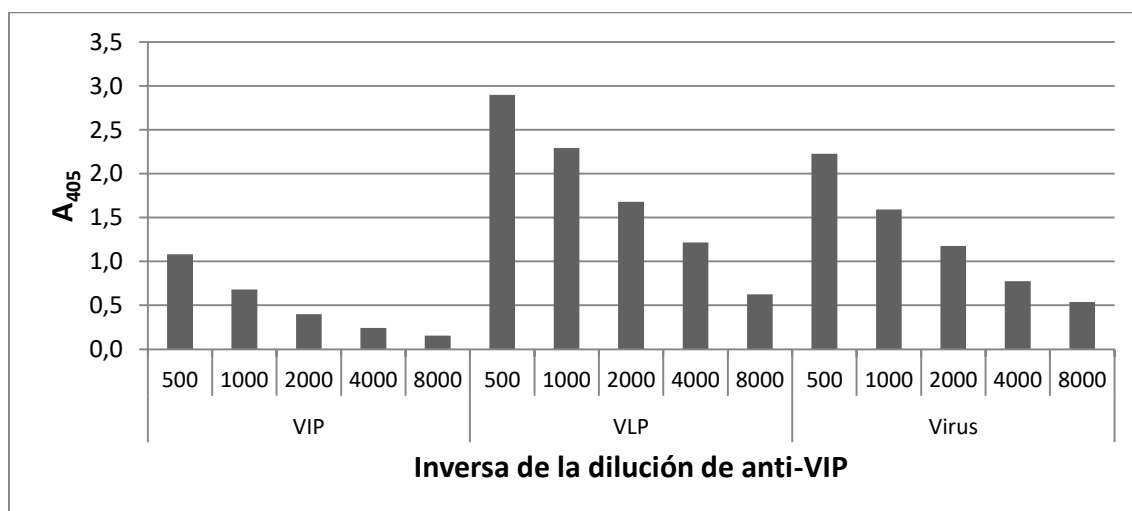


Figura 40. ELISA de sensibilidad de las VNPs conjugadas con VIP en la superficie de la partícula. Se muestran los resultados obtenidos con los distintos tapizados (empleando cantidades equivalentes de péptido) con distintas diluciones del anticuerpo anti-VIP.

5. Multifuncionalización.

Para demostrar la posibilidad de funcionalizar simultáneamente las VNPs en ambos residuos se desarrolló una doble conjugación. Además, se probó una triple funcionalización utilizando una construcción previa con un péptido genéticamente fusionado a la CP (Sánchez y col., 2013). La cisteína se funcionalizó con el compuesto

biotinilado y las lisinas con el fluorescente Alexa 555, obteniéndose dos tipos de doble funcionalización (doble conjugación química o modificación genético-química), además de una triple funcionalización (conjugación doble-química y fusión genética). Los análisis de WB (Figura 41 A) mostraron que la doble conjugación química tuvo lugar tanto en VNPs sin modificación genética como en las genéticamente modificadas. Las imágenes de ISEM (Figura 41 B) mostraron que no hubo modificaciones estructurales en las VNPs multifuncionales, que se inmunodecoraron con ambos anticuerpos.

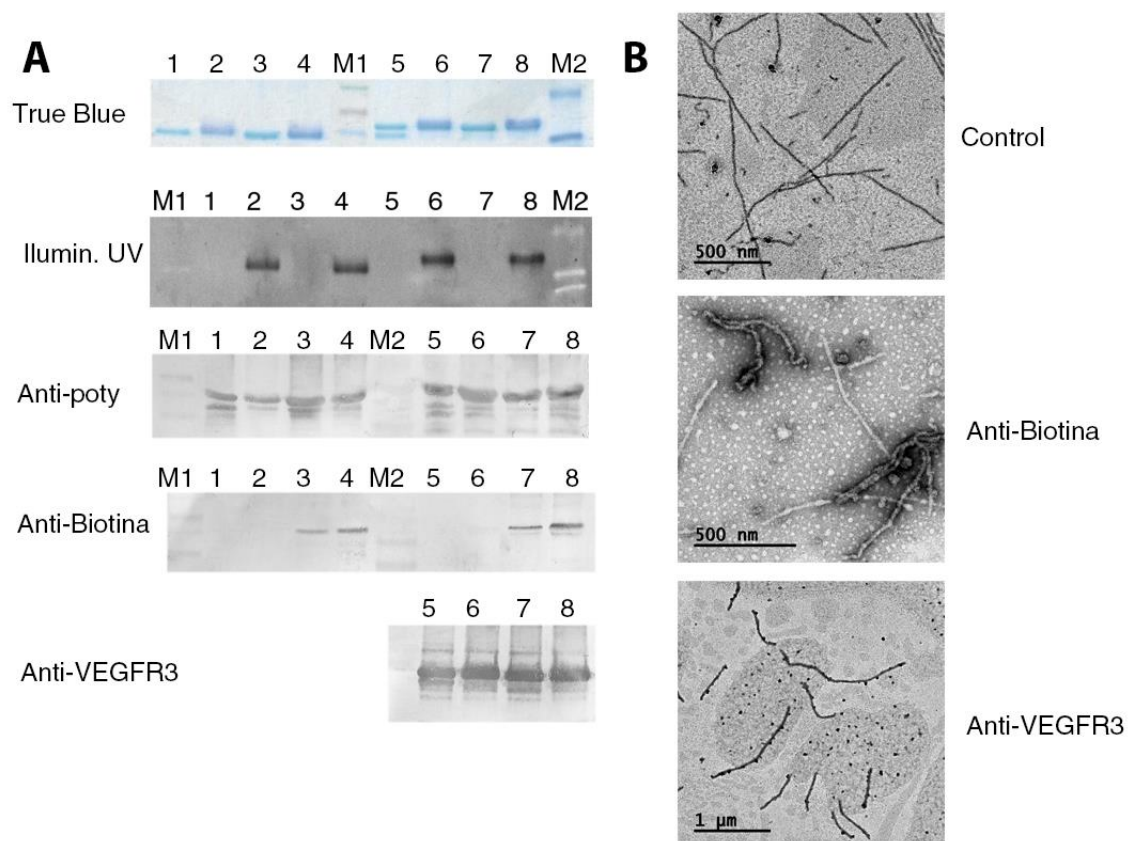


Figura 41. Caracterización de la doble y triple funcionalización. 1-4 viriones sin modificación genética 1- Sin conjugación, 2- Conjugación con Alexa Fluor 555 NHS, 3- Conjugación con iodoacetil-PEG₂-biotina, 4- Conjugación con ambos. 5-8 viriones con péptido VEGFR3 genéticamente fusionado al CP 5- sin conjugación, 6- conjugado con Alexa Fluor 555 NHS, 7- conjugado con iodoacetil-PEG₂-biotina, 8- conjugado con ambos. M1: marcador de peso molecular (kDa), que muestra bandas correspondientes a 31, 38 y 48 kDa. M2: marcador de peso molecular (kDa), que muestra bandas correspondientes a 31 y 45 kDa. A. Conjugaciones en SDS-PAGE 12% analizadas por: tinción de Coomassie, iluminación UV y WB con anticuerpos antipoty, antibiotina y antiVEGFR3. B. Triple funcionalización en TEM con y sin inmunodecoración con anticuerpos antibiotina y antiVEGFR3.

DISCUSIÓN

Después de la obtención de las nanopartículas virales, el reto era poder funcionalizarlas con péptidos que dificultan la producción de VLPs de TuMV, así como proteínas más grandes u otras moléculas con distinta naturaleza química y/o aplicación biotecnológica. Por ello hubo que cambiar la estrategia de funcionalización y pasar a la conjugación química. Hasta ese momento, el único tipo de funcionalización química probada con TuMV era mediante el uso de glutaraldehído para crear nanomallas donde se inmovilizaba la lipasa B de *Candida antarctica*, mejorando en gran medida la actividad enzimática (Cuenca y col., 2016). La conjugación de la CP de TuMV individualmente no se había intentado antes de este trabajo.

Para ir más allá, se desarrolló una multiderivatización que permitiera el diseño de VLPs multifuncionales que puedan presentar varios compuestos simultáneamente con una amplia gama de aplicaciones posibles. Con la ayuda de la estructura resuelta de TuMV, se estableció la disposición espacial de los aminoácidos en la CP de TuMV y en la estructura ensamblada del virus y se pudieron determinar los residuos más convenientes para la conjugación.

Debido a su grupo sulfhidrilo libre, se consideró el residuo de cisteína en la CP como un buen candidato para la conjugación. Este aminoácido formaría enlaces disulfuro con otros ligandos que contuvieran grupos sulfhidrilo en condiciones oxidativas; pudiendo también formar enlaces tioéter por alquilación utilizando moléculas de maleimida o haloacetilo (Henkel y col., 2016; Poole, 2015). Sin embargo, de acuerdo con la estructura, la única cisteína de la CP está en el dominio central, lo que la hace poco accesible para la conjugación. No obstante, intentamos conjugar compuestos a este residuo, ya que de haber una cisteína libre y reactiva disponible en la superficie del virus constituiría una elección excelente para la modificación quimiosselectiva (Fodje y Al-Karadaghi, 2002), permitiendo la funcionalización con aproximadamente 2000 moléculas o péptidos de bajo peso molecular por partícula.

Centrándonos en las lisinas, las aminas libres y su abundancia en la superficie del virión convertían a este residuo en el mejor candidato para obtener un alto nivel de conjugación química. El grupo amino forma enlaces amida muy estables con ligandos que presenten grupos NHS-éster en condiciones fisiológicas, y con más de quince residuos por CP en la superficie más expuesta de las nanopartículas, se podrían

obtener más de dos mil copias del compuesto conjugado con menores restricciones de tamaño y naturaleza química (Hermanson, 2013b; Kalia y Raines, 2010; Lee y col., 2014; Pokorski y Steinmetz, 2011).

El reactivo fluorescente alquilante, I-AEDANS, se utilizó para determinar si el TuMV presentaba grupos sulfhidrilo expuestos. Como control, se analizó un tobamovirus, ya que tienen una única cisteína que no es reactiva. De hecho, para poder emplear este residuo en modificaciones químicas en tobamovirus, los residuos de cisteína deben introducirse mediante ingeniería genética, principalmente en el extremo N-terminal de su CP, quedando expuestos en la superficie y, en consecuencia, disponibles para la conjugación (Koch y col., 2015; McCormick y Palmer, 2008; Royston y col., 2008). Para comprobar la reactividad en lisinas también se empleó un compuesto fluorescente (Alexa Fluor 555) con un grupo NHS-éster capaz de reaccionar con aminas primarias presentes en las lisinas y en el extremo N-terminal de la CP, creando el mencionado enlace amida. Además, se usó otro fluorocromo (Alexa Fluor 488 Azida) para verificar la posibilidad de utilizar la ligación de Staudinger para la conjugación de compuestos más grandes, empleando el reactivo NHS-fosfina como conector. Se obtuvieron las bandas esperadas para ambos tipos de VNPs de TuMV (viriones y VLPs), con un buen nivel de conjugación en todas las reacciones.

Una vez comprobada la accesibilidad y reactividad de la cisteína, se eligió un compuesto biotinilado de bajo peso molecular para ser conjugado. No solo verificamos la conjugación mediante inmunoensayos, sino que al igual que con las modificaciones genéticas (Sánchez y col., 2013) se apreció una mejora en la sensibilidad mediante la presentación multimérica de la biotina en la superficie viral, obteniéndose un aumento en la detección de anticuerpos de quince veces sobre la biotina libre. En este caso, se demostró la posibilidad no solo de conjugar compuestos de bajo peso molecular, sino también de detectarlos mediante anticuerpos con un alto nivel de sensibilidad. Esta metodología permitiría funcionalizar las nanopartículas con otras moléculas pequeñas. Un ejemplo de moléculas pequeñas de interés son los haptenos, difíciles de emplear como sistema de detección en los ensayos estándar (Omi y col., 2015). Siguiendo esta vertiente, la conjugación de péptidos a la CP también puede resultar atractiva.

Si un péptido no solo interfiere con la infección del virus, sino que también dificulta el ensamblado de una VLP, la conjugación química podría ser la solución para emplearlas en la funcionalización de nanopartículas. Mediante inmunoensayos, se confirmó la conjugación del péptido con ambos tipos de VNPs en los dos residuos

estudiados. La conjugación a cisteínas dio lugar a varias bandas, correspondientes a la conjugación de más de un péptido. Esto podría deberse a que el conector se une (aunque con menor afinidad) a otros residuos del péptido, creando una cadena de 2-3 péptidos según el peso molecular de las bandas. Aunque la reactividad iodoacetilo-sulfhidrilo es relativamente selectiva, el yodo también puede reaccionar con metionina, histidina o tirosina en condiciones apropiadas (Hermanson, 2013a, b), lo que explicaría la aparición de varias moléculas de VIP por CP. La conjugación del péptido directamente a lisinas dio incluso más bandas, lo que encajaría con la alta presencia de lisinas en el dominio N-terminal de la CP, expuesto en la superficie viral.

Por otra parte, la conjugación de VIP a cisteína dio lugar a agregados, probablemente porque este conector heterobifuncional reaccionó con las lisinas presentes en otras VNPs creando una nanomalla de VNPs y péptidos. Estas nanomallas no aparecieron en la ligación de Staudinger, por lo que, dependiendo de la aplicación buscada, se puede emplear una u otra estrategia de conjugación. Destaca que las nanopartículas funcionalizadas en el interior, formando agregados, no tendrían potencial en el campo diagnóstico, ya que los resultados del ELISA mostrados en la Figura 36 muestran que no se obtiene ninguna mejora respecto del péptido libre. Sin embargo, la formación de agregados implicaría una gran concentración del péptido en una menor superficie, por lo que podría tener potencial en el tratamiento, ya que de esta forma obtendríamos una alta concentración de péptido y además una estructura más estable. En lo referente a nanopartículas funcionalizadas en la superficie, el resultado del ELISA mostrado en la Figura 40 muestra su potencial diagnóstico, mostrando una sensibilidad un 300% superior a la obtenida con el péptido libre. Estos resultados son un reflejo de la potencialidad de las distintas conjugaciones en función de la aplicación deseada, desde el tratamiento hasta el diagnóstico.

Cabe destacar también que en los casos en que se conjugaron de forma simultánea los dos tipos de VNPs (virión y VLP) se pudo observar un mayor nivel de conjugación en la VLP respecto del virión. Esto respondería a las diferencias estructurales descritas en este virus, mostrando las VLPs una estructura más abierta, dejando un mayor espacio disponible para la conjugación de distintos compuestos.

En este trabajo, se muestra una diversidad de aplicaciones para las VNPs de TuMV como armazones para la presentación multimérica de dos e incluso tres compuestos diferentes de manera simultánea. Además, la diferente naturaleza de estos compuestos debería permitir desarrollar distintas aplicaciones, utilizando no solo péptidos, sino también fluoróforos, fármacos, ligandos, etc. Utilizando otras reacciones

químicas de conjugación en otros aminoácidos se podrían explotar más residuos para la multifuncionalización, combinando más estrategias de conjugación para obtener VNPs multifuncionales.

Las VNPs proporcionan estructuras bien definidas, estables y fáciles de producir, siendo excelentes candidatos para la producción de nuevos materiales y dispositivos a nanoescala. Las características estructurales de la superficie de las VNPs las hace susceptibles de modificaciones químicas o genéticas para adquirir nuevas funciones. Además, la posibilidad de producir VLPs no infecciosas también constituye una ventaja en campos como el biomédico, para lo cual serían apropiadas de acuerdo a los resultados mostrados en referencia a la estabilidad en condiciones fisiológicas de pH y temperatura (Figura 32 y Figura 33). Sin embargo, los esfuerzos descritos en este capítulo representan solo una fracción del potencial de los virus en nanotecnología. Este estudio ha utilizado las VNPs de TuMV como soportes para el desarrollo de nuevas funciones diagnósticas y para el tratamiento. Es probable que los avances futuros busquen funcionalidades más dinámicas en las que las VNPs respondan a señales de entrada derivadas de su entorno o de la interfaz de un dispositivo. Por ejemplo, generar VNPs que puedan detectar, reconocer y dirigirse a un objetivo, para luego entregar una carga, lo que representa una nueva herramienta teranóstica. Esta es solo una de las múltiples posibilidades que pueden ofrecer las VNPs multifuncionales. Este trabajo sienta las bases para el desarrollo de VNPs de TuMV con potencial biotecnológico donde una misma nanopartícula pueda tener simultáneamente funciones complementarias.

CAPÍTULO 4

VNPS DE T_UMV EN EL
DIAGNÓSTICO DE LA
ENFERMEDAD INFLAMATORIA
INTESTINAL

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades autoinmunes son patologías que surgen a raíz de una activación inmune disfuncional en la que se desencadenan respuestas inmunes patológicas dirigidas frente a moléculas propias, denominadas autoantígenos (Davidson y Diamond, 2014). El sistema inmunitario humano, en colaboración con otros sistemas fisiológicos del cuerpo, ha evolucionado para proporcionar el ambiente interior estable requerido para la supervivencia. Es por ello que cobra vital importancia el equilibrio de los mecanismos homeostáticos para reconocer el mundo externo y el interno, dado que cuando este delicado equilibrio se altera, puede sobrevenir la enfermedad autoinmune (Rose y Mackay, 2014).

Se ha demostrado que puede existir un sustrato genético que predispone hacia el desarrollo de estas patologías, produciéndose la activación de la inmunidad innata y adaptativa del individuo. En los últimos años se están llevando a cabo numerosas investigaciones en torno a los mecanismos de regulación del sistema inmune, cuyo objetivo es determinar el equilibrio entre la regulación de la autoinmunidad sin causar inmunosupresión (Davidson y Diamond, 2014).

En estas patologías se desarrolla una reactividad frente a moléculas propias del individuo. Esta autorreactividad va dirigida hacia autoantígenos, es decir, antígenos propios. Los antígenos son moléculas que, ya sea solas o formando parte de una estructura molecular mayor, desencadenan la respuesta del sistema inmunológico y dan lugar a la producción de anticuerpos específicos. En el contexto de patologías autoinmunes serían, por tanto, autoanticuerpos (Andresen y Grotzinger, 2009).

Los péptidos, polímeros de aminoácidos, actúan como antígenos, ya que la respuesta inmune específica que se desarrolla contra ellos implica la producción de anticuerpos contra su secuencia peptídica, que forma parte de la proteína que los contiene. Estos anticuerpos serían monoespecíficos dirigidos a un único epítipo, cuyo dominio variable es idéntico aunque el isotipo varíe (Andresen y Grotzinger, 2009; Larman y col., 2011; Shiba, 2010).

Es por estas características por las que los péptidos pueden ser utilizados como una herramienta eficaz en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes, ya que es con diagnósticos precoces como encontramos un mejor pronóstico y tratamiento de la enfermedad. Dado que este tipo de patologías es causado por la producción de anticuerpos reactivos frente a antígenos propios del paciente, su detección temprana

en fluidos puede ser un método de diagnóstico precoz. Sin embargo, hay problemas que se deben enfrentar, como la gran cantidad de sustancias contenidas en el plasma y otros fluidos humanos que, combinadas con la baja cantidad de anticuerpos autorreactivos en las etapas más tempranas de enfermedades autoinmunes, se traduce en una gran cantidad de ruido si la muestra no se diluye lo suficiente, o en desvanecimiento de la señal si se diluye en exceso, por lo que la búsqueda de sistemas de diagnóstico que amplifiquen la sensibilidad se hace necesaria (Quintana y col., 2008; Ramakrishan y col., 2018). Otro problema a abordar es la dificultad que presentan los péptidos a la hora de inmovilizarlos eficazmente sobre un sustrato sólido, como el de placas de enzimoimmunoensayos (Antimisiaris, 2010).

La patogénesis de los procesos autoinmunes en muchas ocasiones, se asocia a respuestas inflamatorias descontroladas que contribuyen al daño. Un ejemplo de ello es la enfermedad inflamatoria intestinal. Bajo el término de enfermedad inflamatoria intestinal (EII) se incluyen dos trastornos inflamatorios crónicos, la enfermedad de Crohn, caracterizada por la inflamación transmural que generalmente afecta al íleo terminal y/o al intestino grueso, aunque también puede afectar a otras partes del tracto gastrointestinal, y la colitis ulcerosa, que implica el revestimiento de la mucosa del colon; ambos trastornos inflamatorios de carácter crónico (Denmark y Mayer, 2014; Lemmens y col., 2014).

La EII resulta de una compleja interacción entre factores genéticos y factores ambientales desencadenantes. En los últimos años se están estudiando genes de las vías involucradas en el mantenimiento de la homeostasis intestinal como posibles mecanismos implicados en el desarrollo de la patología y otros trastornos intestinales (Denmark y Mayer, 2014; Zhang y col., 2018). Incluso en condiciones fisiológicas, el tracto gastrointestinal se encuentra en un estado continuo de inflamación leve y el sistema inmune es responsable del mantenimiento de la anergia y control de los mecanismos reguladores locales. La interrupción de la homeostasis y la activación prolongada de la respuesta inmune local en el intestino provoca un aumento en la producción de citocinas y quimiocinas inflamatorias que activan la respuesta celular o humoral y estimulan el progreso de la EII (Sobczak y col., 2014).

Dentro de esta patología existen investigaciones en marcha en diversos aspectos. En primer lugar, para la mejora del diagnóstico, la terapia personalizada, y por tanto la mejora de la calidad de vida de los pacientes que sufren de esta patología crónica (Gecse y Vermeire, 2018). En segundo lugar, para ganar nuevos conocimientos sobre la patogénesis multifactorial de estos trastornos (Lemmens y col.,

2014). Muchas de estas investigaciones se llevan a cabo gracias al desarrollo de varios modelos animales representativos capaces de reproducir la sintomatología y patología de la enfermedad. En concreto, en nuestro estudio hemos evaluado un modelo murino inducido por sulfato sódico de dextrano (DSS por sus siglas en inglés), un sulfopolisacárido complejo y ramificado formado por moléculas de glucosa, formando unidades en cadenas de longitud variable. Este compuesto, administrado en el agua de bebida, induce inflamación de la mucosa del colon, así como ulceración, lo que lleva a la pérdida de peso severa y, en casos extremos, letalidad (Kim y col., 2012).

Ya que, dentro de una proteína que actúa como antígeno, son ciertos péptidos los que actúan como epítomos y pueden inducir una respuesta inmune, la detección de autoanticuerpos dirigidos contra estos péptidos o contra las proteínas que los contienen en fluidos como el suero sanguíneo puede ser un método de diagnóstico prometedor en enfermedades inflamatorias autoinmunes.

En nuestro estudio se propone como antígeno la proteína "Heat Shock Protein 60" (Hsp60). Las proteínas de choque térmico son una amplia familia de chaperonas moleculares capaces de reaccionar frente a casos de estrés celular, especialmente en cambios térmicos, motivo por el cual adquieren su nombre. Sin embargo, también responden en otras situaciones de estrés como daños tisulares, lesiones celulares o intoxicación por metales pesados.

Hsp60 es una subfamilia de chaperonina mitocondrial cuyas funciones principales son el plegamiento, transporte y replegamiento de proteínas desde el citoplasma hasta la matriz mitocondrial (Habich y Burkart, 2007). En un entorno extramitocondrial, Hsp60 es capaz de actuar modulando la respuesta inmune asociada a la inflamación (Quintana y col., 2008). Tanto las proteínas completas como los péptidos derivados de las mismas pueden actuar como reguladores naturales de la reacción inflamatoria junto con otras citocinas, quimiocinas y autoanticuerpos; de manera que regulan al sistema inmune (Cohen, 2013; Selli y col., 2017; van Eden y col., 2013; Zhong y col., 2016).

Además de estas características, se ha demostrado la implicación de Hsp60 (y otras subfamilias de las HSP) en diversas patologías inflamatorias y autoinmunes como aterosclerosis, diabetes, artritis reumatoide o esclerosis múltiple; sin olvidarnos de la EII, donde se ha podido observar que la cantidad de Hsp60 en la mucosa intestinal disminuye en respuesta a los tratamientos convencionales (Quintana y Cohen, 2011;

Tomasello y col., 2011). También hay estudios en los que situaciones de estrés regulan al alza su expresión, de manera que cualquier cambio en el microambiente celular desencadena un incremento en la expresión de las HSP (Alard y col., 2014; Ulmanky y col., 2015; Ulmanky y Naparstek, 2018; Zhong y col., 2016).

Si además tenemos en cuenta estudios recientes en los que los niveles de autoanticuerpos dirigidos contra esta familia de proteínas varía en pacientes respecto al grupo control en patologías inflamatorias como las enfermedades intestinales, lo convierten en un gran candidato para el desarrollo de un sistema hipersensible de detección de anticuerpos específicos, determinando su relación con el desarrollo de la patología (Jang y col., 2013; Papuc y col., 2016; Ponnusamy y col., 2018; Ulmanky y col., 2015; Ulmanky y Naparstek, 2018; Zhong y col., 2016).

Por todo ello, se decidió emplear un péptido derivado de la proteína endógena Hsp60, péptido previamente estudiado en esclerosis múltiple, situado entre los aminoácidos 301-320, con la secuencia de aminoácidos KAPGFGDNRKNQLKDMAIAT (Quintana y Cohen, 2011). Se funcionalizaron VNPs de TuMV con este péptido para desarrollar un sistema de detección altamente específico e hipersensible, que podría permitir detectar precozmente la posible variación en los niveles de autoanticuerpos contra Hsp60 en la EII, enfermedad a la que ya se le ha asociado la presencia de autoanticuerpos antiHsp60 (Füst *et al.*, 2012).

RESULTADOS

1. Producción y caracterización de VNPs de TuMV con el péptido Hsp60 301-320

Como primer abordaje en la producción de nanopartículas portadoras del péptido de la proteína Hsp60 se trató de producir viriones infectivos con la proteína de fusión Hsp60-CP. Sin embargo, el péptido interfería con la infectividad del virus, por lo que esta estrategia tuvo que descartarse.

A partir de la construcción en virión, se realizó una segunda construcción para la producción de VLPs modificadas. En este caso sí que se obtuvieron nanopartículas con la proteína de fusión que pudieron ser purificadas. Una vez obtenidas las nanopartículas purificadas, se procedió a su caracterización mediante ensayos de SDS-PAGE y WB, además de una caracterización estructural mediante microscopía electrónica (Figura 42). Los resultados obtenidos mostraron una movilidad electroforética modificada en el caso de la proteína de fusión, consecuencia del aumento en el peso molecular de la misma en aproximadamente 2,5 kDa. También se pudo comprobar que esta proteína de fusión se detectaba específicamente no solo por los anticuerpos dirigidos contra el virus, sino también por aquellos dirigidos contra la proteína Hsp60.

Por último, la caracterización estructural mediante TEM demostró que no había cambios significativos en la estructura de las nanopartículas con el péptido fusionado respecto a las no modificadas, manteniendo la estructura alargada y flexuosa característica de los potyvirus. De aquí en adelante, la nomenclatura empleada para referirnos a estas nanopartículas modificadas será Hsp60-VLPs.

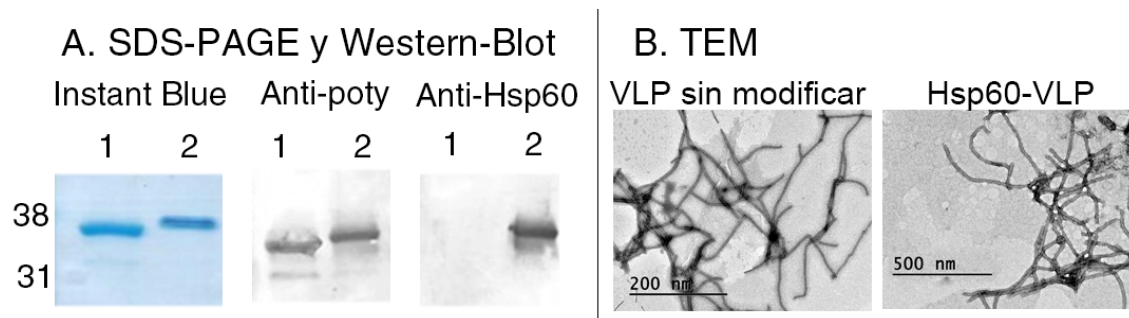


Figura 42. Caracterización de VLPs de Hsp60 (con péptido 301-320). A. SDS-PAGE y WB de nanopartículas sin modificar (1) y modificadas con el péptido de Hsp60 fusionado (2). B. Micrografías de nanopartículas sin modificar y portadoras del péptido.

2. Comparación de la sensibilidad de las VLPs en el reconocimiento de anticuerpos respecto del péptido libre y la proteína Hsp60 completa

Una vez determinada la especificidad en el reconocimiento de las nanopartículas por parte del anticuerpo anti-Hsp60, se requería comparar la sensibilidad del sistema de presentación multimérica en forma de VLPs con los sistemas convencionales basados principalmente en la proteína completa, además de una comparativa con el péptido libre. Para comparar la sensibilidad de las nanopartículas respecto de la proteína completa se realizaron varios inmunoensayos.

Primero se realizó un análisis por ELISA, para el cual se emplearon dos anticuerpos comerciales distintos contra Hsp60: un anticuerpo monoclonal dirigido contra la zona colindante al aminoácido D307 (la secuencia escogida abarca desde el 301 hasta el 320), y un anticuerpo policlonal, además de un anticuerpo específico de potyvirus (antipoty) a modo de control (Figura 43).

En el tapizado se utilizaron dos cantidades diferentes para cada caso, la cantidad a la cual la placa se encuentra saturada con VLPs según ensayos previos de caracterización (1), y la cantidad de proteína Hsp60 comúnmente empleada en enzoinmunoensayos (2), siempre utilizando la proteína completa y las Hsp60-VLPs en relación de equimolaridad. Las cantidades empleadas se reflejan en la Tabla 28.

Tabla 28. Cantidades empleadas en el tapizado del ELISA comparativo.

	Hsp60-VLPs	Proteína Hsp60
Cantidad 1	1000 ng	700 ng
Cantidad 2	140 ng	50 ng

En primer lugar, cabe destacar que los resultados parecen indicar que con cantidades mínimas de Hsp60-VLPs (cantidad 2) nos encontrábamos cerca del nivel de saturación de la placa, ya que las lecturas obtenidas son muy similares a las obtenidas con la cantidad 1 con todos los anticuerpos empleados.

Centrándonos en la sensibilidad, considerando la señal obtenida empleando el anticuerpo monoclonal, tuvimos una respuesta muy parecida en ambos sistemas (proteína Hsp60 completa y Hsp60-VLPs) empleando ambas cantidades. Por otro lado, la señal que se obtuvo empleando el anticuerpo policlonal fue superior en el caso de la proteína Hsp60, resultado esperable teniendo en cuenta el mayor número de epítomos frente a los cuales habría anticuerpos. La señal obtenida con el anticuerpo policlonal en Hsp60-VLPs fue, aunque positiva, considerablemente inferior a la obtenida con otros tapizados.

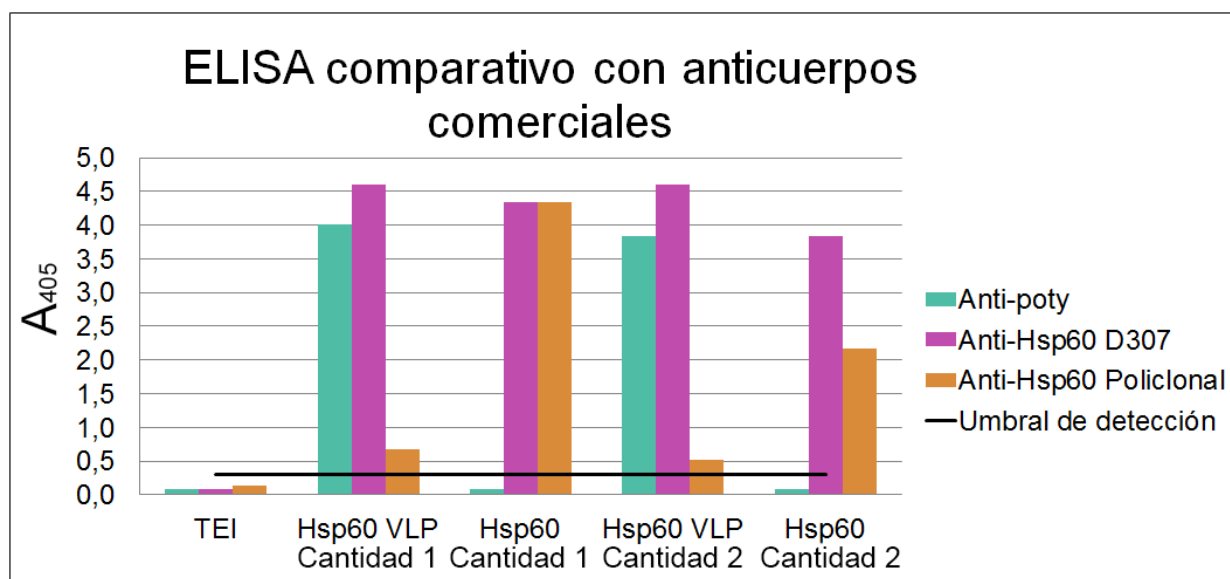


Figura 43. ELISA comparativo Hsp60-VLP con respecto a la Hsp60 completa empleando anticuerpos mono y policlonales con distintas cantidades en el tapizado. TEI: Tampón de extracción de ELISA indirecto, como indicador del fondo de la placa de ensayo con los distintos anticuerpos sin emplear ningún antígeno en el tapizado.

Se realizó otro ensayo tipo ELISA comparativo en el que se tapizó la placa con la cantidad 2 de Hsp60-VLPs y proteína Hsp60 completa (Tabla 28). Con estas condiciones se emplearon diluciones seriadas del anticuerpo monoclonal, estableciendo el nivel de sensibilidad máximo para cada sistema (Figura 44 A). También se realizó un "Dot-Blot" empleando diluciones seriadas de Hsp60-VLPs y proteína Hsp60 completa para determinar la cantidad mínima de antígeno necesaria para el reconocimiento por anticuerpos en membrana, partiendo de la cantidad utilizada en el tapizado del ELISA (Figura 44 B).

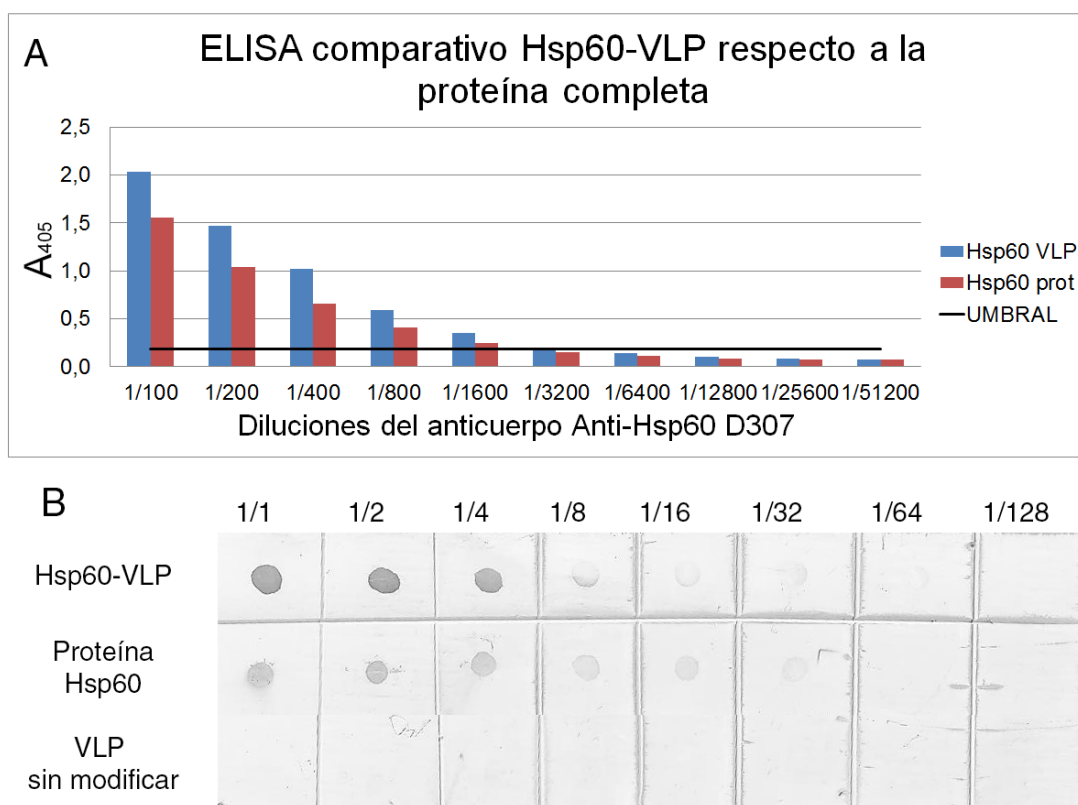


Figura 44. Comparación entre Hsp60-VLPs y la proteína Hsp60 completa. A. ELISA comparativo empleando diluciones seriadas del anticuerpo monoclonal. B. Dot-Blot con cantidades decrecientes de Hsp60-VLPs y proteína Hsp60 completa.

Los resultados obtenidos con la proteína completa no pusieron de manifiesto una mejora sustancial en cuanto a la sensibilidad del sistema. Sin embargo, puesto que lo que se pretendía demostrar no era únicamente la alta sensibilidad del sistema, sino una detección muy específica en la que el diseño y selección del péptido con el que funcionalizar las nanopartículas fuera un punto clave para el diagnóstico, también se realizaron ensayos con el péptido libre.

Se realizaron varios ELISAs e inmunoensayos tipo "Dot-Blot" con las mismas cantidades de Hsp60-VLPs empleadas con los ensayos anteriores, pero en este caso con cantidades equimolares de péptido libre. El primer ensayo consistió en un ELISA en el que se tapizó la placa con la cantidad 2 (Tabla 28) de Hsp60-VLPs y con la cantidad equimolar correspondiente de péptido libre, midiendo la señal obtenida empleando anticuerpo monoclonal. En este caso conviene recalcar los problemas asociados a los inmunoensayos que emplean péptidos en el tapizado, observando que el nivel de sensibilidad que este mostró es mínimo respecto de las Hsp60-VLPs (Figura 45 A). El segundo ensayo nuevamente consistió en un "Dot-Blot" en el que, partiendo de la cantidad empleada en el tapizado del ELISA, se realizaron diluciones seriadas del antígeno (Hsp60-VLPs o péptido libre) para determinar la cantidad mínima necesaria para la detección de anticuerpo anti-Hsp60, requiriendo grandes cantidades de péptido para su detección (Figura 45 B).

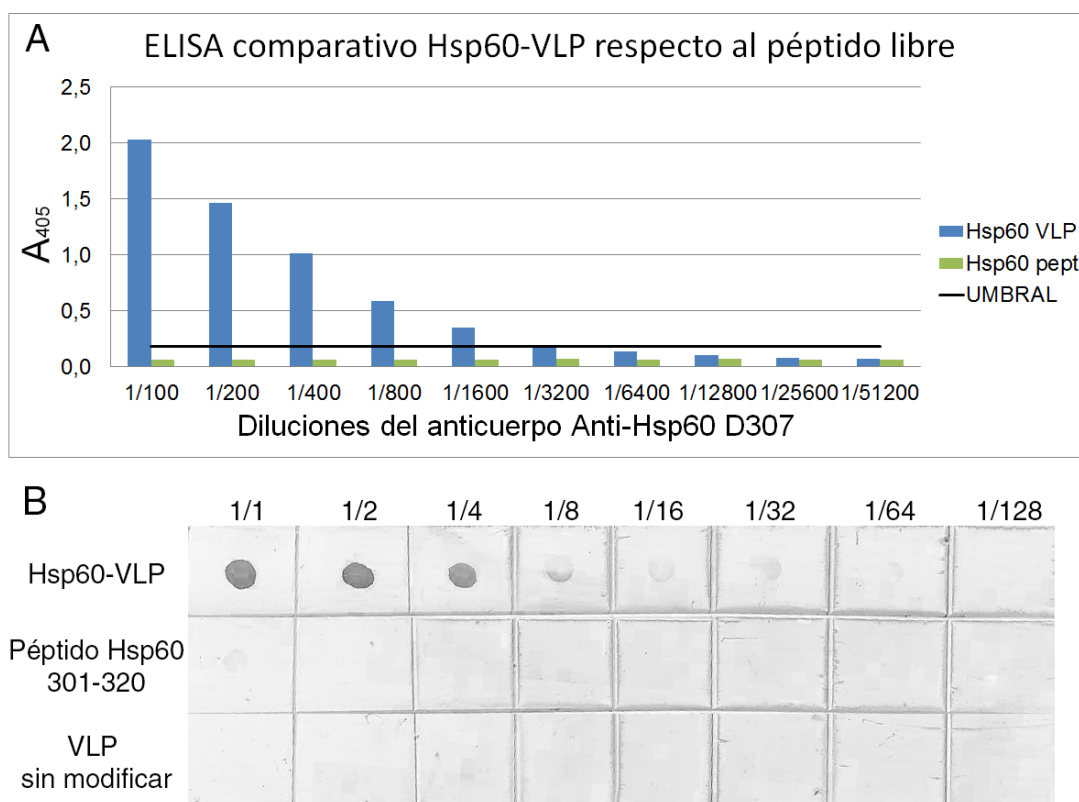


Figura 45. Comparación de Hsp60-VLP respecto al péptido libre. A. ELISA con diluciones seriadas del anticuerpo comercial antiHsp60 D307. La línea negra marca el umbral de detección a partir del cual la señal se considera positiva. B. Dot-blot de diluciones seriadas con cantidades decrecientes de péptido en forma de Hsp60-VLPs o péptido libre, partiendo de la misma cantidad que en el tapizado del ELISA.

Los resultados obtenidos demuestran el potencial estas nanopartículas como sistema de presentación multimérica de péptidos para la detección con alta sensibilidad de anticuerpos en diferentes patologías.

3. Hsp60-VLPs para el diagnóstico de la inflamación intestinal.

Una vez demostrada la alta sensibilidad y especificidad del sistema desarrollado de nanopartículas modificadas, se planteó su aplicación para el diagnóstico de patologías inflamatorias debido a que el nivel de autoanticuerpos en estas enfermedades es normalmente bastante bajo, y por lo tanto se requieren herramientas muy sensibles capaces de detectar de manera temprana cambios en los niveles séricos de anticuerpos anti-Hsp60. Debido a la implicación de la Hsp60 en procesos inflamatorios, se consideró que un modelo murino de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) sería un buen punto de partida.

El primer ensayo que se realizó consistió en comparar las lecturas obtenidas con todos los sistemas de detección (Hsp60-VLPs, proteína Hsp60 completa y péptido libre) con una mezcla o "pool" de sueros de ratones sanos, no inflamados, con el fin de determinar los niveles fisiológicos de los anticuerpos anti-Hsp60 (Figura 46). Se empleó como control negativo el tapizado con VLPs sin modificar (no presentan el péptido de Hsp60). Las cantidades empleadas en los tapizados en este caso son las máximas ensayadas anteriormente, correspondientes a 1 µg de VLPs (tanto Hsp60-VLPs como VLPs sin modificar) y cantidades equimolares de la proteína Hsp60 completa y del péptido libre.

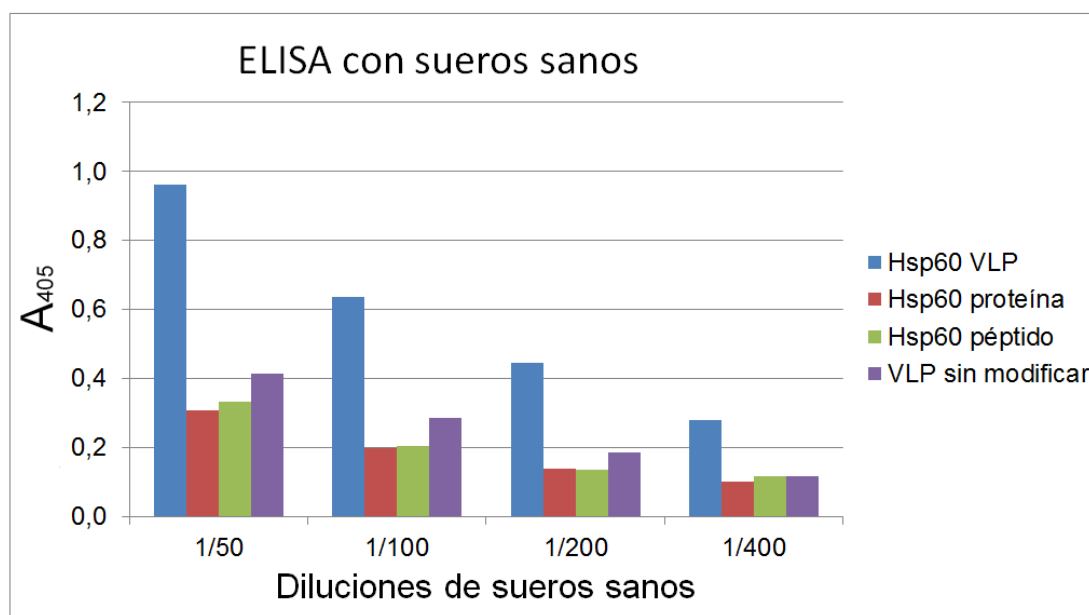


Figura 46. ELISA para la detección de autoanticuerpos anti-Hsp60.

Los resultados muestran que únicamente con las Hsp60-VLPs se pueden detectar niveles de autoanticuerpos antiHsp60 por encima del fondo de la placa y de los controles negativos en los sueros de ratones sanos. Por lo tanto, se demuestra la alta capacidad de las Hsp60-VLPs de detectar niveles de autoanticuerpos que por procedimientos convencionales como el ELISA sería muy difícil detectar.

El siguiente paso fue emplear el modelo murino de EI inducida por DSS, en el que se administra el compuesto químico en el agua de bebida durante 7 días, tras los cuales se retira y se observa una recuperación en los días posteriores. La progresión de la patología, así como la recuperación tras retirar el DSS, se determinó mediante dos parámetros: la pérdida de peso corporal de los ratones y el aumento de los niveles de granulocitos en sangre (Figura 47).

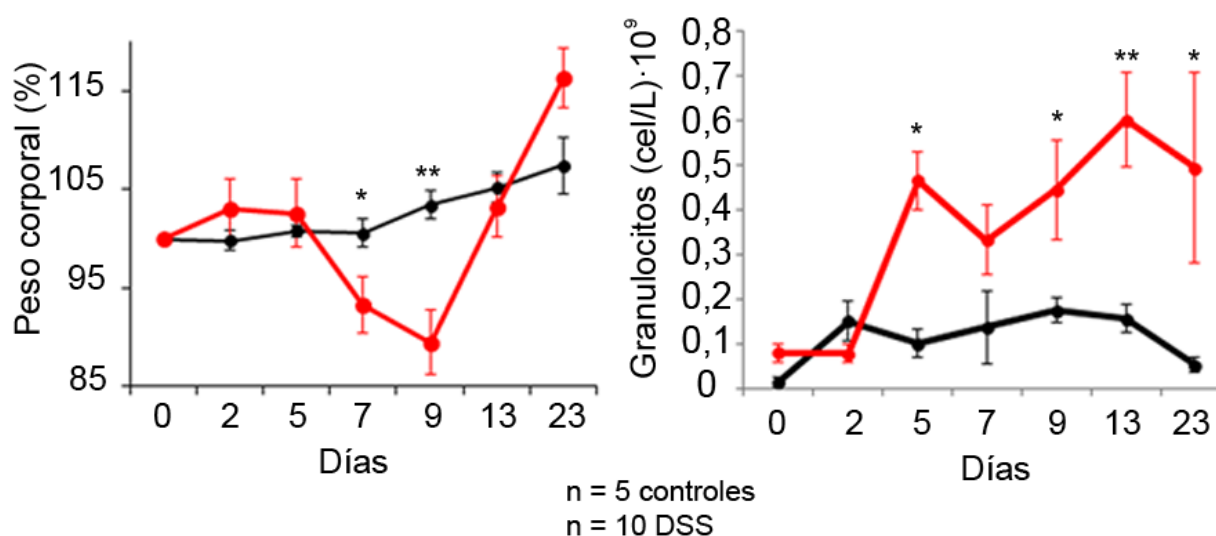


Figura 47. Seguimiento del progreso de la inducción de la patología mediante medidas de peso corporal y niveles de granulocitos en sangre. En negro se representa el grupo control y en rojo se muestra el grupo de ratones tratados con DSS. Se muestran las barras de error estándar de la media, así como aquellos resultados significativos según test no paramétrico U de Mann Whitney (*p ≤ 0,05 ** p ≤ 0,01).

Para evaluar el potencial como herramienta diagnóstica de las Hsp60-VLPs en esta patología, se realizó un nuevo ELISA en el cual se empleó únicamente el tapizado control (VLP sin modificar) y el tapizado con Hsp60-VLPs. Se realizaron dos ensayos, uno correspondiente a un grupo de machos y otro a un grupo de hembras, con los sueros a una dilución 1:100. Se normalizaron los datos eliminando la señal atribuible a los fondos que pueda crear el componente viral de las nanopartículas y se analizaron los resultados de ambos grupos en conjunto (Figura 48).

Los resultados de estos ensayos muestran un descenso de los niveles de autoanticuerpos anti-Hsp60 con el progreso de la inflamación a los 5 y 10 días (según test no paramétrico U de Mann Whitney), manteniéndose los niveles más elevados en los individuos sanos. De acuerdo a estos datos, los niveles de autoanticuerpos anti-Hsp60 podrían emplearse como marcador de inflamación, asumiendo que un descenso en los mismos significaría una respuesta inflamatoria patológica.

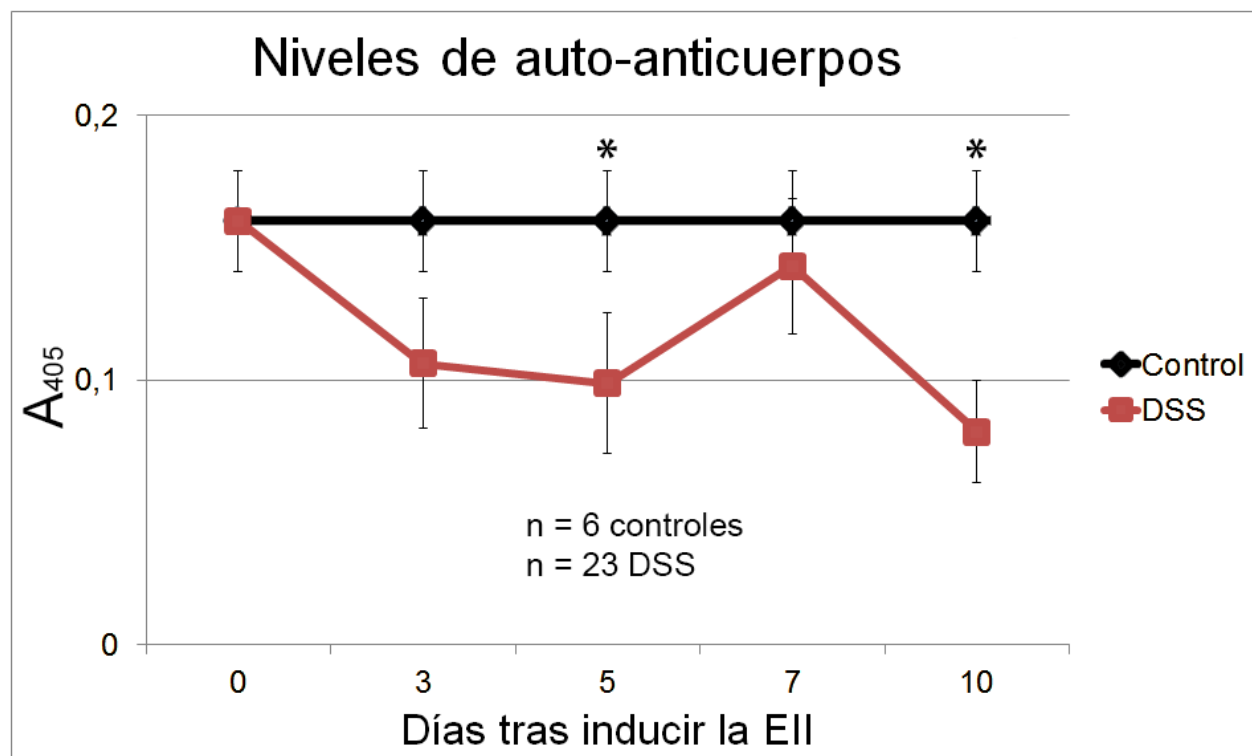


Figura 48. Niveles de autoanticuerpos en el modelo de la EII inducida por DSS. En negro se representa el grupo control, en rojo el inducido por DSS. La línea referente al grupo control se ha definido como la media de todos los datos de dicho grupo, incluyendo también los valores procedentes de los ratones tratados con DSS en el tiempo 0. Se muestran las barras de error estándar de la media, así como aquellos resultados significativos según test no paramétrico U de Mann Whitney (* $p \leq 0,05$).

DISCUSIÓN

Las técnicas actuales se enfrentan a dos serios problemas en la detección de autoanticuerpos en suero. El primero de ellos es el alto nivel de fondo generado por la gran cantidad de sustancias presentes en el suero y el segundo la baja cantidad de autoanticuerpos que aparecen en estas patologías en los primeros estados de la enfermedad, antes de desarrollar una sintomatología evidente, por lo que se requieren metodologías de alta sensibilidad para el diagnóstico (Gecse y Vermeire, 2018; Quintana y col., 2008). Para afrontar estos retos, el empleo de sistemas nanoparticulados como las VLPs virales, donde la presentación multimérica conlleva altos niveles de sensibilidad, se muestra como una posible alternativa para la detección de autoanticuerpos en suero. Se realizaron ensayos en los que la dilución del suero (1:100) debería disminuir los fondos lo suficiente como para no resultar conflictivos, enfrentándonos entonces a la detección de un número menor de autoanticuerpos. Este problema debería solventarse con la alta sensibilidad en la detección que aportan las VLPs.

Evaluando los resultados obtenidos "in vitro" empleando los distintos sistemas de detección con anticuerpos comerciales, no se observó una clara mejora en la detección empleando las VLPs respecto de la proteína recombinante completa. De hecho, únicamente se apreció un ligero incremento en la sensibilidad al emplear anticuerpos dirigidos contra la zona donde se encuentra el epítipo presente en la superficie de las nanopartículas. Empleando anticuerpos policlonales, la señal con las VLPs caía respecto de la proteína completa, de manera que no parece una alternativa que mejore los sistemas de detección convencionales. Como cabría esperar, esto no ocurre con el péptido, que apenas es capaz de detectar los anticuerpos debido a los ya comentados problemas que presentan para adherirse a las placas de ensayo (Antimisialis, 2010). Con estas premisas, decidimos igualmente realizar ensayos en sueros, considerando que una buena elección del epítipo estudiado puede suponer la diferencia a la hora de encontrar correlación entre autoanticuerpos y patología.

En los resultados obtenidos sorprende la ausencia de señal positiva con el uso de la metodología convencional, empleando la proteína recombinante completa en lugar de las VLPs, considerando que en ambos tapizados hay una cantidad equivalente de péptido 301-320 (Figura 48). Este hecho llama la atención no solo porque se trata del autoantígeno natural, sino porque al tratarse de una proteína

completa (de 60 kDa) debería poseer un número muy elevado de epítomos frente a los cuales el sistema inmune fuese capaz de generar autoanticuerpos, tal y como sucedía empleando un anticuerpo policlonal en inmunoensayos *in vitro* (Figura 43). Esto demuestra que la presentación de epítomos en un sistema nanoparticulado es capaz no solo de incrementar la sensibilidad en técnicas de inmunodetección, como ya se había logrado en investigaciones previas (González-Gamboa y col., 2017; Sánchez y col., 2013; Steinmetz, 2010; Yildiz y col., 2011), sino que además la selección de péptidos concretos con características de alta inmunogenicidad aportan un diagnóstico más dirigido. Finalmente, no es de extrañar que el péptido libre no sea capaz de detectar estos anticuerpos por la dificultad de los péptidos de adherirse a las placas de ensayo (Antimisialis, 2010)(Figura 45).

En nuestros resultados es de destacar que los niveles de autoanticuerpos anti-Hsp60 disminuyen con el progreso de inflamación (Figura 48), ocurriendo lo opuesto a lo que cabría esperar. De acuerdo con estos resultados surge una nueva hipótesis en la que los autoanticuerpos de Hsp60 podrían considerarse como marcadores de un estado fisiológico, no patológico, encargados del mantenimiento de la homeostasis inmune ("inmunomodulador"), lo que recientemente se ha denominado "inmunúnculo" ("homúnculo inmune") (Poletaev y Osipenko, 2003), como ya se ha descrito para otras moléculas y autoanticuerpos (Cohen, 2013). Estos resultados avalarían investigaciones previas en las que la administración de anticuerpos dirigidos contra la proteína Hsp60 (Ulmansky y col., 2015; Ulmansky y Naparstek, 2018) o la inmunización con la misma por distintas vías (Leavenworth y col., 2013; Li y col., 2012; van Eden y col., 2013; Zhong y col., 2016) mejoraría la sintomatología asociada a patologías inflamatorias autoinmunes, además de otros estudios en los que se correlaciona la proteína Hsp60 con la enfermedad inflamatoria intestinal (Cappello y col., 2019)

La implicación de esta proteína en enfermedades del tipo autoinmune asociadas a inflamación ha sido muy estudiada en la última década. Generalmente, el desarrollo sintomático de la inflamación va asociado a un aumento en los niveles de Hsp60. Sin embargo, la administración de esta proteína o de péptidos derivados de ella desencadena una respuesta antiinflamatoria que disminuye la inflamación que se desarrolla en la patología. De acuerdo a estos nuevos resultados y teniendo en cuenta que ya hay estudios que relacionan una disminución en los niveles de autoanticuerpos con el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Cohen, 2013), la hipótesis que formulamos es que, de forma natural, la presencia de autoanticuerpos en individuos

sanos aparece como mecanismo homeostático de regulación de la respuesta antiinflamatoria, de forma que estos anticuerpos actuarían impidiendo que la proteína completa o partes de ella desencadenen la respuesta inflamatoria patológica. Esto explicaría por qué, pese a que se asocie el aumento de Hsp60 con el desarrollo de síntomas, una inmunización con el agente fomenta una mejora en los individuos tratados. Así, la patología provocaría un descenso en los niveles de autoanticuerpos, que al no poder intervenir en la regulación, provocan un aumento en la cantidad de Hsp60, lo que a su vez puede desencadenar una respuesta inflamatoria severa (Cappello y col., 2018; Jang y col., 2013; Kolinski y col., 2016; Leavenworth y col., 2013; Li y col., 2012; Meng y col., 2018; Papuc y col., 2016; Pinar y col., 2017; Ponnusamy y col., 2018; Selli y col., 2017; Ulmansky y col., 2015; Ulmansky y Naparstek, 2018; van Eden y col., 2013; Zhong y col., 2016).

El nuevo interrogante que surge es si estos autoanticuerpos presentes en los sueros de ratones podrían actuar como indicador predictivo en el desarrollo de la enfermedad, de manera que se produzca un descenso en su titulación previo al desarrollo de síntomas clínicos. La inducción con DSS comienza el día 0 y se prolonga hasta el día 7, a partir del cual los ratones tratados con DSS comienzan a recibir agua de bebida normal y tienden a la recuperación según los parámetros comúnmente empleados (Figura 47). En estos términos, no existen diferencias significativas con el grupo control hasta los 5 o 7 días, dependiendo del parámetro estudiado. Respecto a los niveles de autoanticuerpos (Figura 48), a los 3 días se observa una tendencia al descenso, que se hace significativa a los 5 días, mostrando una nueva subida a los 7 días para volver a descender de forma significativa a los 10 días. El tamaño muestral limitado junto con el hecho de que los días con diferencias no significativas coinciden con aquellos días con menor número de muestras no permiten concluir rigurosamente el valor predictivo de estos niveles de autoanticuerpos, aunque sí se observa una clara tendencia de los mismos a descender en los individuos tratados con DSS en las primeras etapas de la enfermedad.

Estos resultados parecen prometedores, aunque no serán completamente concluyentes hasta que no se realice un seguimiento en los niveles de IgGs totales, de forma que la pérdida de autoanticuerpos en ratones tratados con DSS no pueda ser atribuida a la caquexia u otros fenómenos fisiológicos asociados a la enfermedad que puedan provocar un descenso en la cantidad total de anticuerpos. Una vez determinada la veracidad de las hipótesis, el empleo de las VLPs funcionalizadas con péptidos de Hsp60 podría emplearse no solo como herramienta diagnóstica, sino

como posible vía de tratamiento por inmunización, ya que también se ha demostrado su gran capacidad inmunogénica respecto de metodologías convencionales (Sánchez y col., 2013).

En cualquier caso, el valor tanto para el tratamiento como para el diagnóstico de estas VLPs en la enfermedad inflamatoria intestinal abre las puertas al desarrollo de nuevas herramientas teranósticas para mejorar el pronóstico de los pacientes con patologías inflamatorias con un diagnóstico específico y precoz, así como con tratamientos dirigidos.

CAPÍTULO 5

NANOPARTÍCULAS DE T_uMV FUNCIONALIZADAS CON PÉPTIDO ANTIMICROBIANO TAQUIPLESINA I

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos es hoy una de las mayores amenazas para la salud mundial. La resistencia a los antibióticos afecta a todos los países. Los pacientes con infecciones causadas por bacterias farmacorresistentes presentan peores pronósticos, además de consumir más recursos sanitarios que los infectados por cepas no resistentes de las mismas bacterias, suponiendo no solo un problema sanitario, sino conllevando además importantes pérdidas económicas. Por ejemplo, la resistencia de *Escherichia coli* a una de las clases de medicamentos más utilizadas en el tratamiento de las infecciones urinarias (las fluoroquinolonas) está muy generalizada. En muchas partes del mundo hay países en los que este tratamiento es ineficaz en más de la mitad de los pacientes. Aunque se trata de un fenómeno que ocurre de manera espontánea en la naturaleza, el abuso y mal uso de antibióticos fomenta la aparición de resistencias, lo que provoca un aumento en los costes médicos, una prolongación de las estancias hospitalarias y un aumento en la mortalidad por sepsis. La lucha contra la resistencia a los antibióticos reviste alta prioridad para la Organización Mundial de la Salud (OMS), de manera que en mayo de 2015 la Asamblea Mundial de la Salud aprobó un plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos, incluida la resistencia a los antibióticos. Su finalidad es asegurar que se pueda seguir previniendo y tratando enfermedades infecciosas mediante fármacos eficaces y seguros (WHO, 2018).

Fuera del campo sanitario, los patógenos microbianos también suponen uno de los principales problemas en el campo agrario, ya que numerosos microorganismos, tanto bacterianos como fúngicos, son capaces de actuar sobre importantes cultivos afectando tanto a la sanidad alimentaria como a la producción, suponiendo también importantes pérdidas económicas. En las últimas décadas, la lucha contra estos patógenos implicaba el empleo de productos químicos de síntesis. El principal problema de su uso es que pueden generar efectos adversos en los consumidores, en el medio ambiente, y además de acumularse en agua y suelo, razón por la cual en los últimos años la legislación ha prohibido o restringido el uso de muchos de los mismos (Karabelas y col., 2009).

Las bacterias patógenas de las plantas ocupan una amplia gama de huéspedes en casi todas las regiones del planeta y en casi todos los tipos de cultivos. Este grupo de patógenos, al que pertenecen principalmente las familias

Xanthomonadaceae, *Pseudomonadaceae* y *Enterobacteriaceae*, se dirige a todo tipo de plantas que puedan sustentarla y servirle de soporte para el crecimiento y la propagación. Los géneros representados con mayor frecuencia son *Dickeya*, *Pectobacterium*, *Pantoea*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Acidovorax*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Streptomyces* y *Xylella*. Las bacterias fitopatógenas a menudo causan desequilibrios hormonales en las plantas infectadas que provocan retraso del crecimiento, crecimiento excesivo, agallas, ramas de la raíz, defoliación, reajuste, epinastia de la hoja y otros. Estos problemas alteran los niveles de nutrición de las plantas afectadas en niveles cualitativos y cuantitativos. También tienen un impacto negativo en el suministro de alimentos y la economía mundial. Además, las plantas infectadas con fitopatógenos propagan moléculas tóxicas a los herbívoros y carnívoros a través de la cadena alimenticia natural, que puede colapsar ecosistemas completos (Rajesh Kannan y col., 2015; Savary y col., 2012).

Como alternativa a los antibióticos y plaguicidas químicos, cada vez toman un mayor protagonismo los péptidos antimicrobianos (AMPs por sus siglas en inglés), ya que su naturaleza peptídica los convierte en una opción segura y natural para el tratamiento de patologías infecciosas. Los AMPs son componentes del sistema inmune innato de muchos organismos, desde hongos hasta seres humanos. Estos péptidos muestran un amplio campo de acción, encontrando alternativas para actuar no solo frente a bacterias y hongos, sino también protozoos o virus (Ciurac y col., 2019; Hazam y col., 2018; Torres y col., 2019), en algunos casos incluso se ha descrito actividad anticancerígena (Bacalum y Radu, 2014).

La taquiplesina I (Tpn I), un péptido antimicrobiano descubierto en el denominado "Cangrejo cacerola chino" (*Tachypleus tridentatus*) forma parte de los péptidos clasificados como catiónicos de lámina β . Este péptido posee un peso molecular de 2263,71 Da y contiene 17 aminoácidos (KWCFRVCYRGICYRRCR), 6 de los cuales son básicos, lo que promueve su interacción con superficies cargadas negativamente. Este péptido contiene además un total de 4 cisteínas, las cuales forman puentes disulfuro que dan lugar a una lámina β muy estable. Se ha demostrado que la taquiplesina I inhibe el crecimiento de bacterias gram negativas y gram positivas, además de presentar actividad antifúngica y antiviral (Edwards y col., 2017; Lee y col., 2016b; Xie y col., 2016), habiéndose descrito incluso especies de plantas transgénicas que expresan el péptido como resistentes a ciertos patógenos (Lipsky y col., 2016). Además, este péptido también es capaz de captar endo- y exotoxinas,

posee actividad inmunomoduladora y le han sido descritas características antitumorales (Kuzmin y col., 2018a; Kuzmin y col., 2018b; Kuzmin y col., 2017).

El mecanismo de acción de la Tpn I no se encuentra descrito en todos sus espectros de acción. Sí se sabe que implica la interacción con lipopolisacáridos en la membrana de bacterias Gram - para aumentar la permeabilidad de las mismas, pero aún se desconoce la interacción con bacterias Gram + y hongos (Kushibiki y col., 2014; Matsuzaki y col., 1991), incluso se ha comparado su mecanismo de acción con el de las defensinas, por su similitud en cuanto a cargas (Ohta y col., 1992). Aunque el mecanismo de acción de este péptido no se entiende completamente, lo que sí se ha demostrado es que es capaz de producir poros en la bicapa lipídica, de manera que se produce fuga de metabolitos y se pierde la turgencia celular (Hong y col., 2015; Imura y col., 2007). También se ha descrito que la interacción de este péptido con otros compuestos, en este caso PEG, no afecta significativamente a su mecanismo de acción, pero sí reduce de forma considerable tanto la actividad antimicrobiana como la citotóxica (Imura y col., 2007) y se han realizado múltiples estudios en cuanto a su estructura y composición aminoacídica para determinar los principios básicos de su actividad (Kuzmin y col., 2018b; Kuzmin y col., 2017; Shi y col., 2018), aunque el mecanismo de acción aún no se haya descrito en profundidad.

Todas las características previamente descritas convierten a este péptido en un gran candidato para el tratamiento de patologías infecciosas provocadas tanto por bacterias como por otro tipo de patógenos, además de poder emplearse también en el tratamiento preventivo de cultivos. Sin embargo, la poca estabilidad y la corta vida media de los péptidos en sistemas vivos lo convierten en un sistema con ciertas limitaciones, de forma que encontrar una plataforma de presentación que le aporte mayor estabilidad y a su vez aumente la concentración efectiva sin afectar significativamente a su actividad podría suponer un importante avance en la lucha frente a microorganismos, evitando el empleo de antibióticos químicos. Es por ello que las nanopartículas de TuMV, que ofrecen distintas vías de funcionalización, cada una con características específicas, podrían permitir la actividad del péptido actuando como superficie con base proteica que permita un aumento en la estabilidad del péptido. Las vías de funcionalización abordan desde un enfoque clásico de fusión genética, hasta diversas aproximaciones de conjugación química en forma de partículas individuales, así como nanomallas.

RESULTADOS

1. Fusión genética de Tpn I

Como primer abordaje en la síntesis de nanopartículas funcionalizadas con la Tpn I se decidió diseñar VLPs con el péptido fusionado genéticamente. No se abordó en primera instancia el diseño de viriones infectivos, ya que algunas de las potenciales aplicaciones implican el uso de las nanopartículas funcionalizadas en el campo agrario, de manera que la posible infección de algunos de los cultivos afectados por los patógenos supondría la no aplicabilidad del sistema.

Tras el diseño de genes sintéticos y las sucesivas clonaciones y transformaciones con la construcción de la proteína de fusión CP-Tpn I, se agroinfiltraron ejemplares de *N. benthamiana* para evaluar la producción de nanopartículas funcionalizadas. Transcurridos varios días se pudo observar en las hojas infiltradas la aparición de grandes áreas necrosadas, coincidentes con aquellas zonas que se habían infiltrado con el cultivo de *A. tumefaciens* (Figura 49A). También se procedió a estimar la producción mediante un ELISA anti-poty de extractos del tejido infiltrado, así como realizar TEM para comprobar la presencia de partículas ensambladas (Figura 49BC).

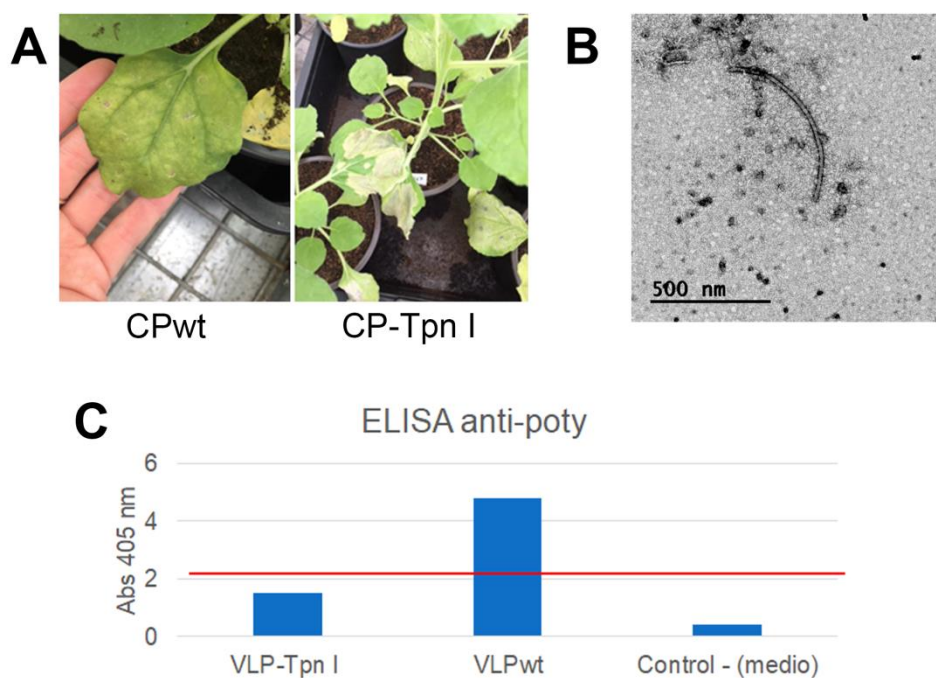


Figura 49. Caracterización de VLPs-Tpn I. A. Hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con construcción correspondiente a la CPwt y a la fusionada con la Tpn I. B. Micrografía

obtenida a partir de tejido agroinfiltrado con CP-Tpn I. C. ELISA antipoty realizado en extractos de tejido agroinfiltrados con ambas construcciones, empleando como control negativo tejido infiltrado con el medio de cultivo. La línea roja representa el umbral a partir del cual la señal se considera positiva.

Los resultados obtenidos muestran un nivel de producción y/o acumulación muy bajos, de manera que abordar la purificación de nanopartículas con el péptido fusionado se considera de extrema dificultad con la metodología habitual y se decidió pasar a las estrategias que implican conjugación química del péptido en cuestión.

2. Conjugación química de Tpn I en la superficie de VNPs

Una vez descartada la estrategia de fusión genética del péptido en VLPs de TuMV, se decidió abordar la conjugación química para la obtención de partículas funcionalizadas con el péptido. Dentro de las estrategias desarrolladas con la plataforma (Capítulo 3), se decidió emplear la conjugación química en lisinas, ya que las aplicaciones buscadas implican tanto un buen nivel de exposición del péptido como una gran concentración efectiva del mismo en la menor superficie posible. Para ello se optó por la síntesis del péptido Tpn I ya derivatizado con una azida en el N-terminal para facilitar la Ligación de Staudinger sin el empleo de varios conectores individuales. Una vez realizada la conjugación siguiendo el protocolo estándar, se caracterizó la misma mediante los ensayos habituales de SDS-PAGE y WB anti-poty (Figura 50). En este caso en concreto, al no disponer de anticuerpos dirigidos contra el péptido, no se realizaron otros inmunoensayos de caracterización.

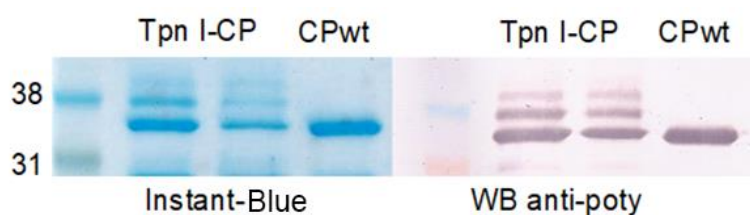


Figura 50. Caracterización de la conjugación química del péptido Tpn I a las lisinas de la CP de TuMV. Las muestras se corresponden con dos ensayos de conjugación empleando un exceso molar de 3X y 5X de péptido respecto de la CP, y un control de la CP sin modificar (CPwt).

Una vez demostrada la conjugación química del péptido a las VNPs de TuMV, se procedió a realizar ensayos antimicrobianos en medio sólido y líquido, empleando cepas de *E. coli*, *D. dadantii*, *P. aeruginosa* y *S. lutea*, todas bacterias Gram -, salvo *S. lutea* (Gram +).

En lo referente a los ensayos en placa, solo se observó la aparición de halos de inhibición con el empleo de kanamicina (Km), de manera que ni el péptido en su forma libre ni en forma conjugada fueron capaces de inhibir el crecimiento microbiano.

Al realizar los ensayos en medio líquido, en primera instancia se empleó la reacción de conjugación directa, de forma que no se hizo una estricta separación entre las nanopartículas conjugadas con Tpn I y la Tpn I libre que no se conjugó con el virus. De acuerdo a esta premisa, se emplearon cantidades para las cuales la Tpn I presente en la muestra (ya sea en forma conjugada o libre) fuese la misma que en el control con Tpn I libre, empleando además un control negativo con VNPs sin modificar, también con cantidades equivalentes, reflejadas en la Tabla 29.

Tabla 29. Cantidades empleadas en los ensayos en medio líquido.

	VNPs (µg/ml)	Tpn I (µg/ml)
Concentración 1	100	50
Concentración 2	50	25
Concentración 3	25	12,5
Concentración 4	12,5	6,25

Los resultados obtenidos para las distintas cepas se muestran en la Figura 51. En ellos se puede comprobar la actividad antimicrobiana que presenta la Tpn I libre, presentando una fuerte capacidad inhibitoria en las cantidades 1 y 2 comparable a la acción de la kanamicina (Km), decreciendo la actividad del péptido libre en las concentraciones menores. En lo referente a las partículas conjugadas, se puede observar un decrecimiento en la actividad del péptido. Para determinar si la conjugación química del péptido causa una inactivación total de la actividad antimicrobiana del mismo, se separaron los componentes de la reacción de conjugación, comprobando que las VNPs conjugadas con Tpn I no presentan capacidad inhibitoria en ninguna de las cepas empleadas (resultados mostrados en la figura con un asterisco). De acuerdo con estos resultados, la conjugación del péptido en su N-terminal impide por su actividad como AMP, de manera que no serían aplicables para el tratamiento contra patógenos bacterianos.

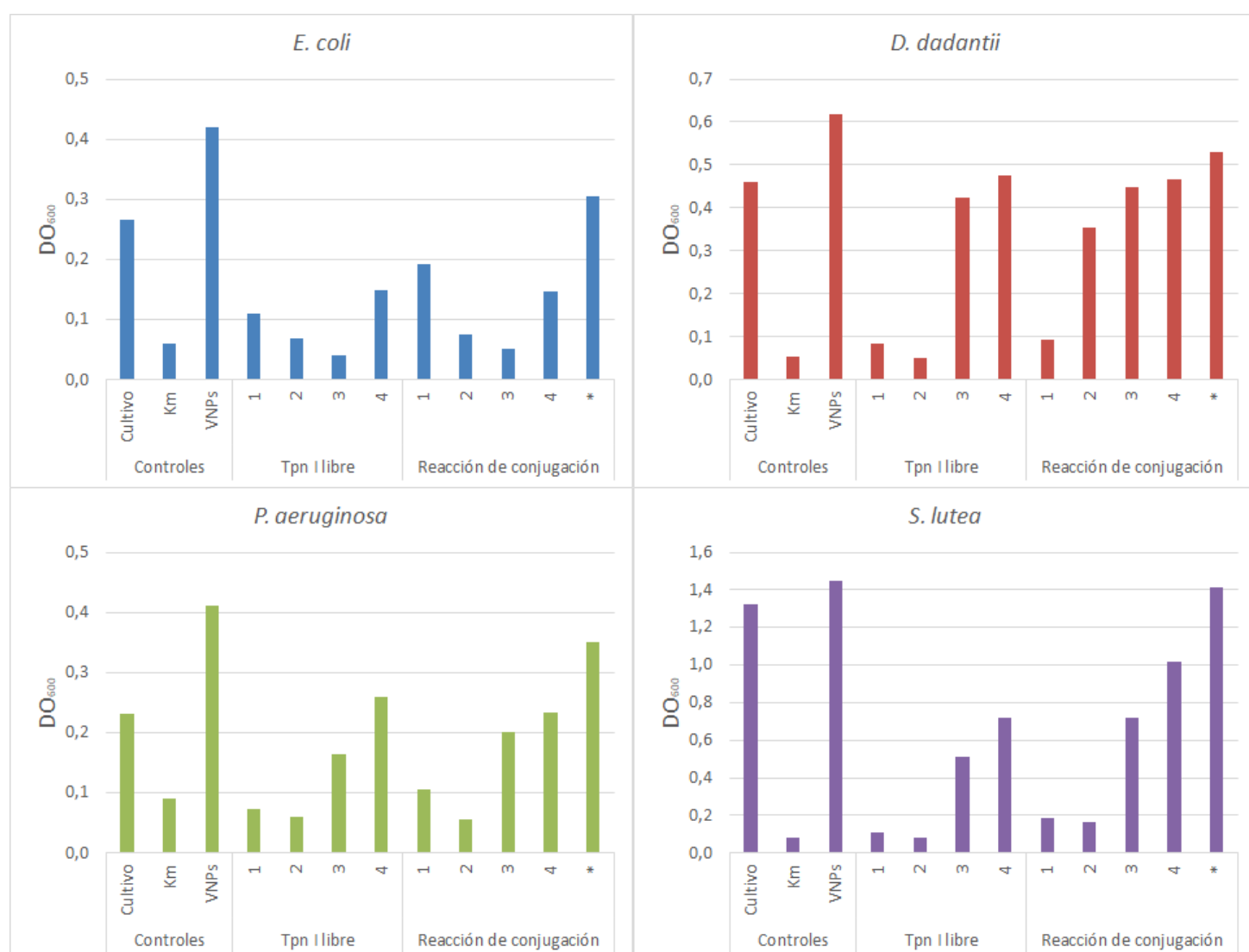


Figura 51. Actividad antimicrobiana de Tpn I libre y conjugada a lisinas en VNPs mediante ligación de Staudinger. Se muestra el crecimiento microbiano en términos de absorbancia a 600 nm en cuatro cepas distintas (*E. coli*, *D. dadantii*, *P. aeruginosa* y *S. lutea*) empleando las cantidades de tratamiento mostradas en la Tabla 29, así como los resultados obtenidos con las partículas conjugadas eliminando el exceso de péptido (*).

3. Formación de nanomallas funcionalizadas con Tpn I

Como alternativa a la conjugación química por ligación de Staudinger, se consideró la formación de nanomallas proteicas, donde la reacción no es específica del dominio N-terminal de la Tpn I, sino que el glutaraldehído actúa como agente entrecruzante que ataca a las aminas libres tanto en las VNPs como en la Tpn I. Para ello se siguió la estrategia descrita con anterioridad (Cuenca y col., 2016), realizando distintos ensayos para la producción de mallas, cuya composición en un volumen final de 1 mL de HEPES 10 mM pH 7,5, se muestra en la Tabla 30.

Tabla 30. Composición de nanomallas empleadas en ensayos antimicrobianos en medio líquido.

	VNPs (µg)	Tpn I (µg)	GA % (v/v)
Malla A	700	20	0,05
Malla B	700	-	0,05
Malla C	-	20	0,05

En este caso, el exceso de GA tuvo que eliminarse mediante filtros Amicon®, ya que el agente entrecruzante en sí mismo presenta actividad citotóxica. Debido a que el tamaño de exclusión de estos filtros es superior al del péptido, también el péptido que no forma parte de la malla se eliminó de la reacción. Los resultados obtenidos con las distintas mallas, empleando las cantidades utilizadas en la Tabla 29 (considerando un nivel de conjugación del 100%) se representan en la Figura 52.

Estos resultados muestran que la actividad antimicrobiana de la Tpn I se pierde al formar parte de mallas con el componente viral o agregados proteicos de Tpn I, en comparación tanto con el péptido Tpn I libre como con la kanamicina (Km).

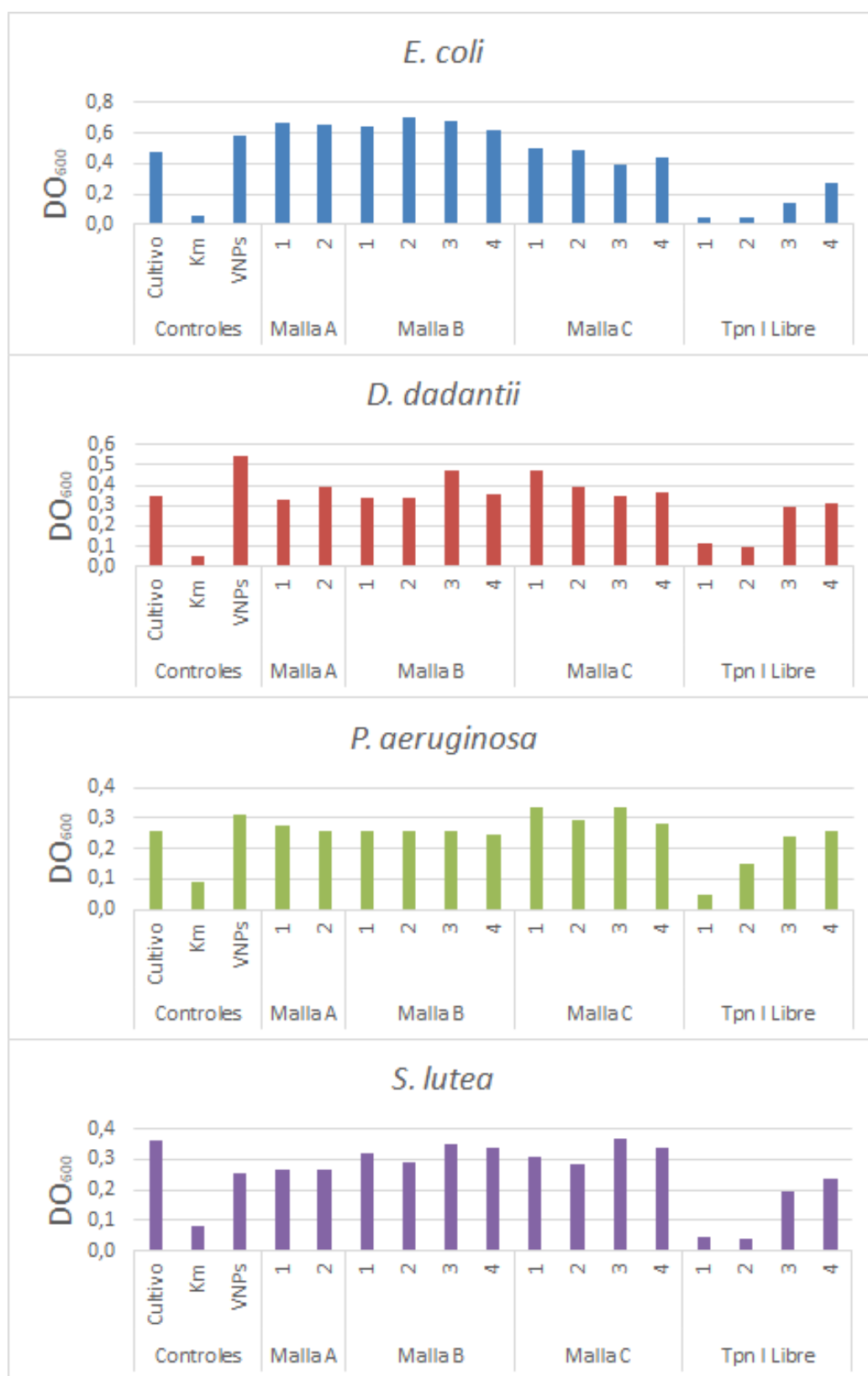


Figura 52. Actividad antimicrobiana de Tpn I libre y conjugada en forma de agregados de Tpn I o formando nanomallas con VNPs mediante conjugación con GA. Se muestra el crecimiento microbiano en términos de absorbancia a 600 nm en cuatro cepas distintas (*E. coli*, *D. dadantii*, *P. aeruginosa* y *S. lutea*) empleando las cantidades 1-4, descritas en la Tabla 29.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo queda demostrada la fuerte actividad antimicrobiana de la taquiplesina I frente a distintas cepas, tanto Gram – como Gram +. La primera característica destacable del AMP en lo referente a los resultados obtenidos es la ausencia de actividad del mismo en medio sólido, presuntamente debido a la falta de permeabilidad que presenta el péptido. Sin embargo, los ensayos en medio líquido muestran una potente actividad del péptido aun en concentraciones muy bajas, de en torno a 20 µg/ml en todos los casos, siendo en ocasiones suficiente una cantidad menos para inhibir el crecimiento microbiano (Figura 49).

Si bien es cierto que existe un amplio nivel de desconocimiento en lo referente al mecanismo de acción de la taquiplesina I, sí está ampliamente descrito que su mecanismo de acción pasa por la interacción con la membrana plasmática, ya sea a través de los lipopolisacáridos en bacterias Gram – o mediante otras vías de interacción aún desconocidas en otros microorganismos como bacterias Gram + u hongos (Ciumac y col., 2019; Edwards y col., 2017; Hong y col., 2015; Imura y col., 2007; Kushibiki y col., 2014; Kuzmin y col., 2018b; Kuzmin y col., 2017; Lee y col., 2016b; Lipsky y col., 2016; Matsuzaki y col., 1991; Ohta y col., 1992). Esta interacción conlleva finalmente a la aparición de poros en la membrana, de forma que la salida de metabolitos y citoplasma de la célula, teniendo este péptido no únicamente capacidad inhibitoria, sino también bactericida. Este mecanismo de acción explicaría los resultados obtenidos en lo referente a la fusión genética (Figura 49), ya que generando una proteína de fusión con el péptido es posible que se hayan generado estos poros en las propias células vegetales, apareciendo en tiempos de producción cortos regiones de tejido necrosado. Estos resultados imposibilitarían la posibilidad de utilizar VNPs de fusión genética funcionalizadas con la Tpn I o cualquier otro péptido antimicrobiano que produzca poros en la membrana celular, pero mostrarían que el péptido Tpn I es capaz de formar poros en la membrana aun estando unido a una proteína de mayor tamaño. No puede asegurarse que en forma ensamblada se conserve esta actividad, ya que las partículas ensambladas encontradas mediante microscopía electrónica son mínimas, y el proceso de agroinfiltración conlleva la producción de proteínas recombinantes, pero no asegura su autoensamblado.

Estos resultados suscitan la posibilidad de la conjugación química para determinar el mantenimiento y posible mejora en la actividad del péptido, por lo que

se abordaron estrategias tanto de conjugación química en la superficie de nanopartículas individuales (Figura 51) como en forma de nanomalla (Figura 52). Para establecer las conclusiones pertinentes, se requiere un análisis detallado de los resultados obtenidos en los distintos sistemas de conjugación. En primer lugar, las partículas individuales conjugadas con Tpn I en la superficie externa del virión no muestran actividad antimicrobiana, incluso empleando concentraciones superiores a las mostradas en el presente capítulo (resultados no mostrados). De acuerdo a ensayos previos donde la actividad de la taquiplesina se ve modificada al alterar ciertos residuos (Kuzmin y col., 2017), es posible que el diseño del péptido con un ácido azidopentanoico en el N-terminal pueda afectar a su actividad al conjugarse con las VNPs. Sin embargo, esta modificación no altera la actividad de la Tpn I en su forma libre, ya que los resultados mostrados en el capítulo siempre son empleando la taquiplesina derivatizada con ácido azidopentanoico en su N-terminal. Todo ello implicaría que el dominio N-terminal interacciona directamente con la membrana plasmática, por lo que se intentó el abordaje mediante nanomallas, obteniendo de nuevo resultados negativos en lo referente a la actividad antimicrobiana. Lo más relevante en lo referente a los ensayos empleando GA no es la ausencia de actividad en la malla que incluye el componente viral, sino en la que únicamente presenta la multimerización del péptido. De acuerdo a los resultados obtenidos, se pueden establecer diversas hipótesis del mecanismo de acción de la taquiplesina I.

Estudios previos apuntan a que el péptido se integra en la membrana para formar los poros, pero en ningún caso se ha establecido la necesidad de internalización (Ciumac y col., 2019; Hong y col., 2015; Imura y col., 2007; Kushibiki y col., 2014). En el caso en concreto de la funcionalización mediante ligación de Staudinger, la conjugación al virus, sobre todo teniendo en cuenta que la concentración del péptido en una superficie mínima es muy alta, no debería implicar impedimentos para que el péptido perfore la membrana, si bien es cierto que la conjugación escogida requiere necesariamente que el dominio N-terminal se encuentre unido a la superficie viral. De acuerdo a estos resultados, y teniendo en cuenta la estructura de horquilla del péptido (Shi y col., 2018), es posible que el dominio N-terminal o el C-terminal sean los que necesariamente se internalicen en profundidad en la membrana, o al menos sean los dominios implicados con la interacción con la misma. De acuerdo a esta hipótesis, el diseño de una estrategia de conjugación capaz de conjugar el péptido atacando a distintas posiciones del mismo podría esclarecer alguno de los planteamientos. Por ello, plantear conjugaciones

alternativas permitiría determinar si el péptido tiene que encontrarse necesariamente en estado libre para ser activo.

En lo referente a las nanomallas realizadas con VNPs y Tpn I, esta aproximación ya no plantea el bloqueo de una región concreta, ya que el GA puede atacar cualquiera de las aminas libres del péptido (Cuenca y col., 2016). Lo que sí plantea es una menor accesibilidad del péptido para formar poros en la membrana, ya que, aunque sí habría péptidos expuestos en la superficie de la malla, la mayoría se encontraría en la intrincada red proteica. Esto no ocurriría al exponer la Tpn I libre a la presencia de GA, donde se formarían no mallas, sino agregados proteicos con el péptido. En ninguno de los casos descritos se obtiene una actividad antimicrobiana en los ensayos realizados, por lo que se pone de manifiesto la inaccesibilidad del péptido de forma multimérica para perforar la membrana bacteriana.

Todos los resultados obtenidos parecen indicar que realmente la Tpn I requiere encontrarse de forma libre para presentar actividad, hipótesis sustentada por los resultados obtenidos en estudios previos donde el péptido se une a PEG. Estas conclusiones serían aplicables a todos aquellos AMPs cuyo mecanismo de acción suponga la formación de poros en la membrana plasmática. Todo ello implicaría que la problemática en cuanto a estabilidad y biodisponibilidad no podría resolverse, al menos con la metodología aplicada hasta el momento. Se podría explotar la posibilidad de distintas conjugaciones químicas para determinar si la exposición de una región concreta del péptido permite su actividad aun encontrándose multimerizado, pero la estrategia a seguir más prometedora podría consistir en un sistema de conjugación reversible en condiciones determinadas, ya sea de pH, temperatura, o en presencia de algún compuesto químico concreto. De esta manera, se podría estabilizar el péptido en una plataforma multimérica hasta requerir su actividad antimicrobiana, momento en el cual se expondría a un estímulo concreto para de esta manera liberar al péptido y activar sus funciones. También podría emplearse como tratamiento antiviral o antitumoral, según el caso en concreto, para lo que también sería interesante la activación en función del ambiente.

Todas las hipótesis planteadas buscan una metodología aplicable no solo a este péptido antimicrobiano, sino a todas aquellas moléculas inestables que requieren encontrarse en estado libre para ser activas. El desarrollo de nuevos sistemas de funcionalización que impliquen la liberación controlada de compuestos, ya sean péptidos u otro tipo de compuestos, como por ejemplo drogas, permitiría un diseño

aún más específico y dirigido a la aplicación concreta, pasando a un nuevo nivel en lo que a nanobiotecnología se refiere.

V. DISCUSIÓN GENERAL

La nanobiotecnología se ha convertido en una disciplina en constante crecimiento, no solo por la gran variedad de nanopartículas orgánicas e inorgánicas que existen a día de hoy, sino por la multitud de aplicaciones para las que estas nanobiotecnologías pueden emplearse (Alemzadeh y col., 2018; Pokorski y Steinmetz, 2011; Steinmetz, 2010; Wen y col., 2015; Yildiz y col., 2011). El desarrollo tecnológico de una nueva plataforma viral para su uso en la nanobiotecnología abarca numerosos campos y disciplinas, como ha quedado demostrado en el presente trabajo. La base conceptual sobre la que se apoya esta tesis es la resolución estructural del virus estudiado, el *Virus del mosaico del nabo*, gracias a los últimos avances en criomicroscopía electrónica para la resolución estructural de virus flexibles (Aguirrezabala y col., 2015; Clare y Orlova, 2010; Zamora y col., 2017).

La resolución estructural ha clarificado la disposición de las subunidades en el virión, localizando espacialmente el dominio central de las mismas, quedando el dominio C-terminal en el poro central y el dominio N-terminal expuesto en la superficie viral. Estas características no solo sustentan las publicaciones previas donde se emplea el dominio N-terminal para la fusión genética (González-Gamboa y col., 2017; Sánchez y col., 2013), quedando el péptido en la superficie externa del virus, sino que además han permitido determinar la localización espacial de regiones y aminoácidos determinados. También han permitido establecer las diferencias estructurales que aparecen en ausencia de ARN, en las eVLPs de TuMV, siendo unas partículas más abiertas y accesibles. Esto permite que la conjugación química a residuos internos, como la cisteína, presenten mayores tasas de conjugación en VLPs que en viriones.

El emplazamiento interno del dominio C-terminal, hasta antes de estos estudios considerado también expuesto en la superficie viral (Baratova y col., 2001; Shukla y col., 1988; Shukla y col., 1989), ha planteado nuevas hipótesis de su aplicabilidad en el campo biotecnológico, surgiendo como nueva alternativa para la funcionalización en aquellos casos donde la molécula en cuestión deba encontrarse en una región interna más protegida. Además, el diseño de los distintos mutantes delecionados también ha permitido considerar la escisión de este dominio, obteniendo nuevas nanopartículas con tendencia a la fragmentación. Estas nanopartículas sugieren de nuevo una aplicación más que requiera la liberación del compuesto con el que se funcionalicen las nanopartículas. En lo referente al dominio N-terminal, su localización en la superficie viral no ha supuesto ningún descubrimiento novedoso, aunque sí las interacciones que se generan entre el dominio y las subunidades cercanas, siendo esta región imprescindible en el ensamblado de la partícula viral. Además, la localización de la

mayoría de los residuos de lisina en la región no resuelta, presuntamente más flexible y expuesta en la superficie de la VNP, sustenta la elección de este residuo para la conjugación química tapizando toda la superficie con una gran cantidad de moléculas. En este sentido, la conjugación química en lisinas ha permitido la funcionalización de VNPs con compuestos de distinta naturaleza química (Alemzadeh y col., 2018; de Dios y Díaz-García, 2010; Jewett y Patolsky, 2013; Koudelka y Manchester, 2010; Le y col., 2017b; Lee y col., 2014; Pokorski y Steinmetz, 2011; Steinmetz, 2010; Strable y Finn, 2009), desde fluoróforos hasta péptidos que imposibilitan la fusión genética, ampliando los campos de aplicación de la plataforma, conservando además la capacidad incrementada de detección de anticuerpos.

Todos los puntos anteriormente citados, relacionados principalmente con el desarrollo tecnológico de la plataforma de VNPs de TuMV, muestran la diversidad de opciones que ofrecen las nanopartículas virales para su aplicación en el campo biotecnológico, desde la biomedicina hasta procesos de producción o tratamiento en el campo agrario (Park y col., 2019; Pitek y col., 2018; Shukla y col., 2019; Wang y col., 2019). El desarrollo de aplicaciones con VNPs de TuMV se encuentra aún en las primeras fases de investigación, arrojando resultados prometedores en varios de los campos citados (González-Gamboa y col., 2017; Sánchez y col., 2013). Además, en esta tesis se muestra la diversidad de sistemas de funcionalización disponibles para TuMV, desde la fusión genética de péptidos o pequeñas proteínas, hasta la conjugación química de distintos compuestos o incluso la formación de nano/micromallas. Con esto lo que se pretende demostrar es que, dependiendo de la aplicación buscada, las diversas alternativas que ofrece la plataforma permiten el diseño de múltiples estrategias, hasta lograr encontrar la solución adecuada para cada caso.

Como ejemplos de la aplicabilidad de las VNPs funcionalizadas, mostramos nanopartículas portadoras de un péptido de Hsp60 como herramienta para el diagnóstico diferencial de la enfermedad inflamatoria intestinal. Los resultados obtenidos demuestran no solo la alta sensibilidad de las VNPs funcionalizadas, sino que el diseño de las mismas utilizando los antígenos más relevantes en la patología supone una gran diferencia. Este sistema no permitiría únicamente un diagnóstico precoz, lo que mejora el pronóstico de los pacientes, sino que en patologías donde los autoanticuerpos actúen como moduladores de la respuesta inmune (Cappello y col., 2019; Cohen, 2013; Poletaev y Osipenko, 2003), como es este caso en concreto de acuerdo a los resultados, las VNPs funcionalizadas también podrían emplearse como

herramienta terapéutica. Esta posible aplicación de VNPs en terapia ya ha sido estudiada en el TuMV para inmunización, y en otros virus con estructura similar en tratamientos más complejos como quimioterapia dirigida. La nanobiotecnología se presenta, por tanto, como una nueva alternativa biosegura de los denominados agentes teranósticos (Alemzadeh y col., 2018; Blandino y col., 2015; Le y col., 2017a; Pitek y col., 2016; Steinmetz, 2010; Yildiz y col., 2011). El desarrollo de este tipo de plataformas junto con un estudio exhaustivo de las patologías a tratar permitiría el diseño a la carta de agentes teranósticos, reduciendo los riesgos del uso de partículas metálicas y añadiendo ventajas como la penetrabilidad o la bioseguridad.

Por último, y para visibilizar las opciones que ofrece esta tecnología, en el presente trabajo se ha demostrado la posibilidad de multifuncionalización de VNPs de TuMV. Este nuevo avance tecnológico permitirá el diseño a la carta de herramientas nanotecnológicas para diversas aplicaciones. Hasta el momento solo se ha demostrado la triple funcionalización, empleando la conjugación química en dos residuos (cisteína y lisina) junto con la conjugación genética. Sin embargo, además de las posibles funcionalizaciones por fusión genética que se ofrecen al considerar los mutantes de delección, la conjugación química está en constante expansión (Alemzadeh y col., 2018; Henkel y col., 2016; Le y col., 2017b; Rawtani y col., 2018), y el ataque a otros residuos aminoacídicos se abre a futuras vías de multifuncionalización. Por un lado, tenemos la posibilidad de fusionar genéticamente proteínas de mayor calibre en el N-terminal delecionado, además de la fusión de péptidos pequeños en el C-terminal, localizándose en el interior del poro viral. Por otro lado, la conjugación química en otros residuos por la gran variedad de grupos químicos que presentan también abre las puertas a la conjugación simultánea en otras localizaciones del virión. Con ello podrían obtenerse nanopartículas que, de manera simultánea, pudiesen aplicarse en campos distintos. Por ejemplo, podrían generarse nanopartículas portadoras de una proteína o anticuerpo que permita el reconocimiento específico de un tipo celular, que además llevaran una droga específica en el interior y por último algún compuesto fluorescente para el seguimiento. Con estas partículas podríamos hacer un tratamiento dirigido y ponerlo a prueba en distintos cultivos celulares, donde la fluorescencia nos permitiera realizar un seguimiento específico. También podrían emplearse partículas que por un lado porten un anticuerpo y por otro un antígeno, pudiendo emplearse tanto para el diagnóstico como para el tratamiento. O incluso partículas que portasen algún compuesto metálico y fármacos que permitieran la localización mediante sistemas magnéticos.

Con todo ello, la caracterización de la plataforma en este trabajo pone de manifiesto la posibilidad de realizar diseños específicos de VNPs de TuMV en diversos campos biotecnológicos, donde las posibles aplicaciones a desarrollar se muestran numerosas, a falta de poner a punto todas las posibles vías de funcionalización que la plataforma permita. Todo ello sustenta el crecimiento que la nanobiotecnología está obteniendo, tomando cada año mayor protagonismo y siendo una prometedora vía de explotación en biotecnología.

VI. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente Tesis han permitido concluir:

1. La estructura del virión de TuMV, resuelta mediante microscopía electrónica, presenta una similitud superior al 90% con la obtenida previamente con WMV.
2. Las eVLPs de TuMV presentan una estructura muy similar a la del virión, pero con unas conexiones entre subunidades más laxas, permitiendo una mayor libertad de movimiento, siendo partículas más abiertas.
3. La delección total o parcial de los dominios N-terminal o C-terminal de la CP de TuMV interfieren en el proceso infectivo del virus.
4. La delección total del dominio N-terminal de la CP impide el ensamblado de eVLPs.
5. La delección parcial del dominio N-terminal de la CP permite el ensamblado de partículas, que se agrupan formando agregados.
6. La delección total del dominio C-terminal terminal de la CP da lugar a eVLPs con una estructura más flexuosa y alargada, a la larga inestable por el fraccionamiento de estas partículas.
7. La delección parcial del dominio C-terminal terminal de la CP da lugar a eVLPs con una longitud hasta 4 veces superior a la de las VLPs-wt.
8. Es posible la conjugación química de compuestos químicos de bajo peso molecular y péptidos a la cisteína de la CP, permitiendo la funcionalización de regiones internas de las VNPs.
9. Es posible la conjugación química de compuestos de bajo peso molecular y péptidos a las lisinas de la CP, permitiendo la funcionalización de regiones expuestas de las VNPs.
10. Se han obtenido nanopartículas multifuncionalizadas con hasta 3 compuestos, empleando simultáneamente la fusión genética en el N-terminal y la conjugación química a cisteína y lisinas.
11. Las nanopartículas funcionalizadas con el péptido Hsp60 (301-320) permiten la detección en el descenso de autoanticuerpos inducido en el modelo de la EII, descenso indetectable con la metodología convencional.
12. Las nanopartículas funcionalizadas con Tpn I no han mostrado actividad antimicrobiana, poniendo de manifiesto ciertas características del mecanismo de acción de este péptido para futuras investigaciones.

VII. REFERENCIAS

- Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkoczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.-W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C., Zwart, P.H. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D* **66**, 213-221.
- Agirrezabala, X., Méndez-López, E., Lasso, G., Sánchez-Pina, M.A., Aranda, M., Valle, M. (2015) The near-atomic cryoEM structure of a flexible filamentous plant virus shows homology of its coat protein with nucleoproteins of animal viruses. *Elife* **4**, e11795.
- Alard, J.E., Pers, J.O., Youinou, P., Jamin, C. (2014) Chapter 41 - Heat Shock Protein autoantibodies, in: Shoenfeld, Y., Meroni, P.L., Gershwin, M.E. (Eds.), *Autoantibodies* (Third Edition). Elsevier, San Diego, pp. 343-348.
- Alemzadeh, E., Dehshahri, A., Izadpanah, K., Ahmadi, F. (2018) Plant virus nanoparticles: Novel and robust nanocarriers for drug delivery and imaging. *Colloids Surf B Biointerfaces* **167**, 20-27.
- Alonso, J.M., Gorzny, M.L., Bittner, A.M. (2013) The physics of Tobacco mosaic virus and virus-based devices in biotechnology. *Trends Biotechnol* **31**, 530-538.
- An, G. (1987) Binary Ti vectors for plant transformation and promoter analysis. *Methods Enzymol* **153**, 292-305.
- Andresen, H., Grotzinger, C. (2009) Deciphering the antibodyome - peptide arrays for serum antibody biomarker diagnostics. *Curr Proteomics* **6**, 1-12.
- Anindya, R., Savithri, H.S. (2003) Surface-exposed amino- and carboxy-terminal residues are crucial for the initiation of assembly in Pepper vein banding virus: a flexuous rod-shaped virus. *Virology* **316**, 325-336.
- Antimisariis, G.S. (2010) Protein/peptide drug delivery: advanced drug delivery systems (DDSs). *Biotech International* **22**, 10-13.
- Ausar, S.F., Foubert, T.R., Hudson, M.H., Vedvick, T.S., Middaugh, C.R. (2006) Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles. Effect of pH and temperature. *J Biol Chem* **281**, 19478-19488.
- Bacalum, M., Radu, M. (2014) Cationic antimicrobial peptides cytotoxicity on mammalian cells: an analysis using therapeutic index integrative concept. *Int J Pept Res Ther* **21**, 47-55.
- Baratova, L.A., Efimov, A.V., Dobrov, E.N., Fedorova, N.V., Hunt, R., Badun, G.A., Ksenofontov, A.L., Torrance, L., Jarvekul, L. (2001) In situ spatial organization of Potato virus A coat protein subunits as assessed by tritium bombardment. *J Virol* **75**, 9696-9702.
- Barcena, J., Blanco, E. (2013) Design of novel vaccines based on virus-like particles or chimeric virions. *Subcell Biochem* **68**, 631-665.
- Bendahmane, M., Koo, M., Karrer, E., Beachy, R.N. (1999) Display of epitopes on the surface of Tobacco mosaic virus: impact of charge and isoelectric point of the epitope on virus-host interactions. *J Mol Biol* **290**, 9-20.
- Bendahmane, M., Szecsi, J., Chen, I., Berg, R.H., Beachy, R.N. (2002) Characterization of mutant Tobacco mosaic virus coat protein that interferes with virus cell-to-cell movement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3645-3650.
- Benelli, G. (2016) Green synthesized nanoparticles in the fight against mosquito-borne diseases and cancer-a brief review. *Enzyme Microb Technol* **95**, 58-68.
- Blandino, A., Lico, C., Baschieri, S., Barberini, L., Ciroffo, C., Blasi, P., Santi, L. (2015) In vitro and in vivo toxicity evaluation of plant virus nanocarriers. *Colloids Surf B Biointerfaces* **129**, 130-136.

- Bradford, M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Britannica (2018)** Nanoparticle, Encyclopædia britannica, <https://www.britannica.com/science/nanoparticle>.
- Bruckman, M.A., Czapar, A.E., VanMeter, A., Randolph, L.N., Steinmetz, N.F. (2016)** Tobacco mosaic virus-based protein nanoparticles and nanorods for chemotherapy delivery targeting breast cancer. *J Control Release* **231**, 103-113.
- Brunt, A.A. (1992)** The general properties of potyviruses, in: Barnett, O.W. (Ed.), *Potyvirus Taxonomy*. Springer Vienna, Vienna, pp. 3-16.
- Canizares, M.C., Lomonossoff, G.P., Nicholson, L. (2005)** Development of Cowpea mosaic virus-based vectors for the production of vaccines in plants. *Expert Rev Vaccines* **4**, 687-697.
- Capek, I. (2015)** Viral nanoparticles, noble metal decorated viruses and their nanoconjugates. *Adv Colloid Interface Sci* **222**, 119-134.
- Cappello, F., Conway de Macario, E., Rappa, F., Zummo, G., Macario, A.J.L. (2018)** Immunohistochemistry of human Hsp60 in health and disease: from autoimmunity to cancer. *Methods Mol Biol* **1709**, 293-305.
- Cappello, F., Mazzola, M., Jurjus, A., Zeenny, M.N., Jurjus, R., Carini, F., Leone, A., Bonaventura, G., Tomasello, G., Bucchieri, F., Conway de Macario, E., Macario, A.J.L. (2019)** Hsp60 as a novel target in IBD management: a prospect. *Front Pharmacol* **10**, 26.
- Cardenas-Vargas, A., Elizondo-Quiroga, D., Gutierrez-Ortega, A., Charles-Nino, C., Pedroza-Roldan, C. (2016)** Evaluation of the immunogenicity of a potyvirus-like particle as an adjuvant of a synthetic peptide. *Viral Immunol* **29**, 557-564.
- Chariou, P.L., Lee, K.L., Pokorski, J.K., Saidel, G.M., Steinmetz, N.F. (2016)** Diffusion and uptake of Tobacco mosaic virus as therapeutic carrier in tumor tissue: effect of nanoparticle aspect ratio. *J Phys Chem B* **120**, 6120-6129.
- Charudattan, R., Hiebert, E. (2007)** A plant virus as a bioherbicide for tropical soda apple, *Solanum viarum*. *Pestic Biochem Physiol* **18**, 167-171.
- Chen, F., Hableel, G., Zhao, E.R., Jokerst, J.V. (2018)** Multifunctional nanomedicine with silica: Role of silica in nanoparticles for theranostic, imaging, and drug monitoring. *J Colloid Interface Sci* **521**, 261-279.
- Chen, V.B., Arendall, W.B., 3rd, Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J., Murray, L.W., Richardson, J.S., Richardson, D.C. (2010)** MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 12-21.
- Chen, X., Zaro, J.L., Shen, W.C. (2013)** Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev* **65**, 1357-1369.
- Ciumac, D., Gong, H., Hu, X., Lu, J.R. (2019)** Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. *J Colloid Interface Sci* **537**, 163-185.
- Clare, D.K., Orlova, E.V. (2010)** 4.6 Å Cryo-EM reconstruction of Tobacco mosaic virus from images recorded at 300 keV on a 4k x 4k CCD camera. *J Struct Biol* **171**, 303-308.
- Cohen, I.R. (2013)** Autoantibody repertoires, natural biomarkers, and system controllers. *Trends Immunol* **34**, 620-625.
- Comellas-Aragones, M., Engelkamp, H., Claessen, V.I., Sommerdijk, N.A., Rowan, A.E., Christianen, P.C., Maan, J.C., Verduin, B.J., Cornelissen, J.J., Nolte, R.J. (2007)** A virus-based single-enzyme nanoreactor. *Nat Nanotechnol* **2**, 635-639.
- Cruz-Fernández, C.F. (2011)** A novel and safe nanoplateform for epitope presentation, Departamento de Biotecnología de Virus Vegetales. UAM, Madrid.
- Cuenca, S., Mansilla, C., Aguado, M., Yuste-Calvo, C., Sánchez, F., Sánchez-Montero, J.M., Ponz, F. (2016)** Nanonets derived from Turnip mosaic virus as scaffolds for

- increased enzymatic activity of immobilized *Candida antarctica* lipase B. *Front Plant Sci* **7**, 464.
- D'Aoust, M.A., Couture, M.M., Charland, N., Trepanier, S., Landry, N., Ors, F., Vezina, L.P. (2010)** The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnol J* **8**, 607-619.
- Davidson, A., Diamond, B. (2014)** Chapter 3 - General features of autoimmune disease, in: Rose, N.R., Mackay, I.R. (Eds.), *The Autoimmune Diseases* (Fifth Edition). Academic Press, Boston, pp. 19-37.
- de Dios, A.S., Díaz-García, M.E. (2010)** Multifunctional nanoparticles: analytical prospects. *Anal Chim Acta* **666**, 1-22.
- de Pinho Favaro, M.T., Sánchez-García, L., Sánchez-Chardi, A., Roldán, M., Unzueta, U., Serna, N., Cano-Garrido, O., Rodrigues-Azzoni, A., Ferrer-Miralles, N., Villaverde, A., Vázquez, E. (2018)** Protein nanoparticles are nontoxic, tuneable cell stressors. *Nanomedicine* **13**, 255-268.
- Dedeo, M.T., Finley, D.T., Francis, M.B. (2011)** Viral capsids as self-assembling templates for new materials. *Prog Mol Biol Transl Sci* **103**, 353-392.
- Delgado, M., Abad, C., Martínez, C., Juarranz, M.G., Arranz, A., Gomariz, R.P., Leceta, J. (2002)** Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. *J Mol Med (Berl)* **80**, 16-24.
- Delgado, M., Ganea, D. (2013)** Vasoactive intestinal peptide: a neuropeptide with pleiotropic immune functions. *Amino Acids* **45**, 25-39.
- Denmark, V.K., Mayer, L. (2014)** Chapter 60 - Inflammatory Bowel Diseases, in: Rose, N.R., Mackay, I.R. (Eds.), *The Autoimmune Diseases* (Fifth Edition). Academic Press, Boston, pp. 873-888.
- DiMaio, F., Chen, C.C., Yu, X., Frenz, B., Hsu, Y.H., Lin, N.S., Egelman, E.H. (2015)** The molecular basis for flexibility in the flexible filamentous plant viruses. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 642-644.
- Dolja, V., Haldemann-Cahill, R., Montgomery, A., Vandenbosch, K., Carrington, J. (1995)** Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of Tobacco etch potyvirus. *Virology* **206**, 1007-1016.
- Donchenko, E.K., Pechnikova, E.V., Mishyna, M.Y., Manukhova, T.I., Sokolova, O.S., Nikitin, N.A., Atabekov, J.G., Karpova, O.V. (2017)** Structure and properties of virions and virus-like particles derived from the coat protein of *Alternanthera mosaic virus*. *PLoS One* **12**, e0183824.
- Dordick, J.S., Lee, K.H. (2014)** Editorial overview: Nanobiotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **28**, iv-v.
- Edwards, I.A., Elliott, A.G., Kavanagh, A.M., Blaskovich, M.A.T., Cooper, M.A. (2017)** Structure-activity and -toxicity relationships of the antimicrobial peptide Tachyplesin-1. *ACS Infect Dis* **3**, 917-926.
- El ouazizi, B. (2010)** Desarrollo de la plataforma nanobiotecnológica basada en viriones del potyvirus del mosaico del nabo, con posibles aplicaciones diagnósticas biomédicas. , Departamento de Biotecnología de Virus Vegetales. UPM, Madrid.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., Cowtan, K. (2010)** Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 486-501.
- Esfandiari, N., Arzanani, M.K., Soleimani, M., Kohi-Habibi, M., Svendsen, W.E. (2016)** A new application of plant virus nanoparticles as drug delivery in breast cancer. *Tumour Biol* **37**, 1229-1236.
- Fakruddin, M., Hossain, Z., Afroz, H. (2012)** Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective. *J Nanobiotechnology* **10**, 31.

- Fernández-Fernández, M.R., Martínez-Torrecuadrada, J.L., Casal, J.I., García, J.A. (1998)** Development of an antigen presentation system based on plum pox potyvirus. *FEBS Lett* **427**, 229-235.
- Fodje, M.N., Al-Karadaghi, S. (2002)** Occurrence, conformational features and amino acid propensities for the π -helix. *Protein Eng* **15**, 353-358.
- Gecse, K.B., Vermeire, S. (2018)** Differential diagnosis of inflammatory bowel disease: imitations and complications. *Lancet Gastroenterol Hepatol* **3**, 644-653.
- Geiger, F.C., Eber, F.J., Eiben, S., Mueller, A., Jeske, H., Spatz, J.P., Wege, C. (2013)** TMV nanorods with programmed longitudinal domains of differently addressable coat proteins. *Nanoscale* **5**, 3808-3816.
- Geng, Y., Dalhaimer, P., Cai, S., Tsai, R., Tewari, M., Minko, T., Discher, D.E. (2007)** Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nat Nanotechnol* **2**, 249-255.
- Glasner, J.D., Yang, C.H., Reverchon, S., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Bohin, J.P., Van Gijsegem, F., Yang, S., Franza, T., Expert, D., Plunkett, G., 3rd, San Francisco, M.J., Charkowski, A.O., Py, B., Bell, K., Rauscher, L., Rodriguez-Palenzuela, P., Toussaint, A., Holeva, M.C., He, S.Y., Douet, V., Boccara, M., Blanco, C., Toth, I., Anderson, B.D., Biehl, B.S., Mau, B., Flynn, S.M., Barras, F., Lindeberg, M., Birch, P.R., Tsuyumu, S., Shi, X., Hibbing, M., Yap, M.N., Carpentier, M., Dassa, E., Umehara, M., Kim, J.F., Rusch, M., Soni, P., Mayhew, G.F., Fouts, D.E., Gill, S.R., Blattner, F.R., Keen, N.T., Perna, N.T. (2011)** Genome sequence of the plant-pathogenic bacterium *Dickeya dadantii* 3937. *J Bacteriol* **193**, 2076-2077.
- Gleba, Y., Klimyuk, V., Marillonnet, S. (2007)** Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr Opin Biotechnol* **18**, 134-141.
- González-Gamboa, I. (2011)** An epitope-presentation system: A nanotechnological approach to a biological paradigm, Departamento de Biotecnología de Virus Vegetales. CBGP-INIA. UPM, Madrid.
- González-Gamboa, I., Manrique, P., Sánchez, F., Ponz, F. (2017)** Plant-made potyvirus-like particles used for log-increasing antibody sensing capacity. *J Biotechnol* **254**, 17-24.
- Grgacic, E.V., Anderson, D.A. (2006)** Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods* **40**, 60-65.
- Grill, L.K., Palmer, K.E., Pogue, G.P. (2005)** Use of plant viruses for production of plant-derived vaccines. *Crit Rev Plant Sci* **24**, 309-323.
- Gutiérrez, P., Bastos-Aristizábal, S., Marín, M. (2011)** Modelación estructural de la proteína de la cápside del virus de la papa (PVA, potyvirus). *Actual Biol (Medellin)* **33**, 93-102.
- Habich, C., Burkart, V. (2007)** Heat shock protein 60: regulatory role on innate immune cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 742-751.
- Hansen, S., Lehr, C.M. (2012)** Nanoparticles for transcutaneous vaccination. *Microbial biotechnology* **5**, 156-167.
- Haruyama, T. (2003)** Micro- and nanobiotechnology for biosensing cellular responses. *Adv Drug Delivery Rev* **55**, 393-401.
- Hazam, P.K., Goyal, R., Ramakrishnan, V. (2018)** Peptide based antimicrobials: Design strategies and therapeutic potential. *Prog Biophys Mol Biol* **xxx**, 1-13.
- He, S., Scheres, S.H.W. (2017)** Helical reconstruction in RELION. *J Struct Biol* **198**, 163-176.
- Hema, M., Subba Reddy Ch, V., Savithri, H.S., Sreenivasulu, P. (2008)** Assembly of recombinant coat protein of *Sugarcane streak mosaic virus* into potyvirus-like particles. *Indian J Exp Biol* **46**, 793-796.
- Henkel, M., Röckendorf, N., Frey, A. (2016)** Selective and efficient cysteine conjugation by maleimides in the presence of phosphine reductants. *Bioconjug Chem* **27**, 2260-2265.

- Hermanson, G.T. (2013a)** Chapter 6 - Heterobifunctional Crosslinkers, *Bioconjugate Techniques* (Third edition). Academic Press, Boston, pp. 299-339.
- Hermanson, G.T. (2013b)** Chapter 17 - Chemoselective Ligation; Bioorthogonal Reagents, *Bioconjugate Techniques* (Third edition). Academic Press, Boston, pp. 757-785.
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, R.A. (1983)** A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**, 179.
- Hollings, M., Brunt, A.A. (1981)** Potyvirus Group. *Descriptions of Plant Viruses*, 245.
- Hong, J., Guan, W., Jin, G., Zhao, H., Jiang, X., Dai, J. (2015)** Mechanism of tachypleisin I injury to bacterial membranes and intracellular enzymes, determined by laser confocal scanning microscopy and flow cytometry. *Microbiol Res* **170**, 69-77.
- Howorka, S. (2011)** Rationally engineering natural protein assemblies in nanobiotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **22**, 485-491.
- Huang, Z., Elkin, G., Maloney, B.J., Beuhner, N., Arntzen, C.J., Thanavala, Y., Mason, H.S. (2005)** Virus-like particle expression and assembly in plants: hepatitis B and Norwalk viruses. *Vaccine* **23**, 1851-1858.
- Huynh, N.T., Hesketh, E.L., Saxena, P., Meshcheriakova, Y., Ku, Y.C., Hoang, L.T., Johnson, J.E., Ranson, N.A., Lomonossoff, G.P., Reddy, V.S. (2016)** Crystal structure and proteomics analysis of empty virus-like particles of Cowpea mosaic virus. *Structure* **24**, 567-575.
- Ibort, P. (2011)** Turnip mosaic virus-based nanoplatfroms for applications in nanobiotechnology, Departamento de Biotecnología de Virus Vegetales. CBGP-INIA. UPM, Madrid.
- Imura, Y., Nishida, M., Ogawa, Y., Takakura, Y., Matsuzaki, K. (2007)** Action mechanism of tachypleisin I and effects of PEGylation. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 1160-1169.
- Jagadish, M., Ward, C.W., Gough, K.H., Tulloch, P.A., Whittaker, L.A., Shukla, D.D. (1991)** Expression of potyvirus coat protein in *Escherichia coli* and yeast and its assembly into virus-like particles. *J Gen Virol* **72**, 1543-1550.
- Jang, E.J., Jung, K.Y., Hwang, E., Jang, Y.J. (2013)** Characterization of human anti-heat shock protein 60 monoclonal autoantibody Fab fragments in atherosclerosis: genetic and functional analysis. *Mol Immunol* **54**, 338-346.
- Jewett, M.C., Patolsky, F. (2013)** Nanobiotechnology: synthetic biology meets materials science. *Curr Opin Biotechnol* **24**, 551-554.
- Johnson, J., Lin, T., Lomonossoff, G. (1997)** Presentation of heterologous peptides on plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* **35**, 67-86.
- Kadri, A., Maiss, E., Amsharov, N., Bittner, A.M., Balci, S., Kern, K., Jeske, H., Wege, C. (2011)** Engineered Tobacco mosaic virus mutants with distinct physical characteristics in planta and enhanced metallization properties. *Virus Res* **157**, 35-46.
- Kalia, J., Raines, R.T. (2010)** Advances in Bioconjugation. *Curr Org Chem* **14**, 138-147.
- Kalinciema, I., Skrastina, D., Ose, V., Pumpens, P., Zeltins, A. (2012)** Potato virus Y-like particles as a new carrier for the presentation of foreign protein stretches. *Mol Biotechnol* **52**, 129-139.
- Kang, K., Lim, J.S. (2012)** Induction of functional changes of dendritic cells by silica nanoparticles. *Immune network* **12**, 104-112.
- Kang, S.H., Lim, W.S., Hwang, S.H., Park, J.W., Choi, H.S., Kim, K.H. (2006)** Importance of the C-terminal domain of Soybean mosaic virus coat protein for subunit interactions. *J Gen Virol* **87**, 225-229.
- Karabelas, A.J., Plakas, K.V., Solomou, E.S., Drossou, V., Sarigiannis, D.A. (2009)** Impact of European legislation on marketed pesticides: a view from the standpoint of health impact assessment studies. *Environ Int* **35**, 1096-1107.

- Kellnerová, S. (2018)** Funcionalización de nanopartículas virales (VNPs) derivadas de un virus de planta con fines de protección vegetal. Universidad Complutense de Madrid.
- Kendall, A., Bian, W., Maris, A., Azzo, C., Groom, J., Williams, D., Shi, J., Stewart, P.L., Wall, J.S., Stubbs, G. (2013)** A common structure for the potexviruses. *Virology* **436**, 173-178.
- Kendall, A., McDonald, M., Bian, W., Bowles, T., Baumgarten, S.C., Shi, J., Stewart, P.L., Bullitt, E., Gore, D., Irving, T.C., Havens, W.M., Ghabrial, S.A., Wall, J.S., Stubbs, G. (2008)** Structure of flexible filamentous plant viruses. *J Virol* **82**, 9546-9554.
- Kendall, A., McDonald, M., Stubbs, G. (2007)** Precise determination of the helical repeat of Tobacco mosaic virus. *Virology* **369**, 226-227.
- Kendall, C.G., Stockton, A.M., Leicht, S., McCaig, H., Chung, S., Scott, V., Zhong, F., Lin, Y. (2015)** Amine analysis using alexafluor 488 succinimidyl ester and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence. *J Anal Methods Chem* **2015**, 368362.
- Khudyakov, Y., Pumpens, P. (2015)** Viral Nanotechnology.
- Kim, D.-J., Kim, K.-S., Song, M.-Y., Seo, S.-H., Kim, S.-J., Yang, B.-G., Jang, M.-H., Sung, Y.-C. (2012)** Delivery of IL-12p40 ameliorates DSS-induced colitis by suppressing IL-17A expression and inflammation in the intestinal mucosa. *Clinical Immunology* **144**, 190-199.
- Kim, J., Lee, J.E., Lee, S.H., Yu, J.H., Lee, J.H., Park, T.G., Hyeon, T. (2008)** Designed fabrication of a multifunctional polymer nanomedical platform for simultaneous cancer-targeted imaging and magnetically guided drug delivery. *Adv Mater* **20**, 478-483.
- Kimalov, B., Gal-On, A., Stav, R., Belausov, E., Arazi, T. (2004)** Maintenance of coat protein N-terminal net charge and not primary sequence is essential for Zucchini yellow mosaic virus systemic infectivity. *J Gen Virol* **85**, 3421-3430.
- King, T., Osmond-Mcleod, M.J., Duffy, L.L. (2018)** Nanotechnology in the food sector and potential applications for the poultry industry. *Trends Food Sci Technol* **72**, 62-73.
- Klockgether, J., Munder, A., Neugebauer, J., Davenport, C.F., Stanke, F., Larbig, K.D., Heeb, S., Schock, U., Pohl, T.M., Wiehlmann, L., Tummler, B. (2010)** Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. *J Bacteriol* **192**, 1113-1121.
- Koch, C., Wabbel, K., Eber, F.J., Krolla-Sidenstein, P., Azucena, C., Gliemann, H., Eiben, S., Geiger, F., Wege, C. (2015)** Modified TMV particles as beneficial scaffolds to present sensor enzymes. *Front Plant Sci* **6**, 1137.
- Kolinski, T., Marek-Trzonkowska, N., Trzonkowski, P., Siebert, J. (2016)** Heat shock proteins (HSPs) in the homeostasis of regulatory T cells (Tregs). *Cent Eur J Immunol* **41**, 317-323.
- Kong, Q., Richter, L., Yang, Y.F., Arntzen, C.J., Mason, H.S., Thanavala, Y. (2001)** Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. *proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11539-11544.
- Koudelka, K.J., Manchester, M. (2010)** Chemically modified viruses: principles and applications. *Curr Opin Chem Biol* **14**, 810-817.
- Kumar, S., Ochoa, W., Singh, P., Hsu, C., Schneemann, A., Manchester, M., Olson, M., Reddy, V. (2009)** Tomato bushy stunt virus (TBSV), a versatile platform for polyvalent display of antigenic epitopes and vaccine design. *Virology* **388**, 185-190.
- Kushibiki, T., Kamiya, M., Aizawa, T., Kumaki, Y., Kikukawa, T., Mizuguchi, M., Demura, M., Kawabata, S., Kawano, K. (2014)** Interaction between tachyplesin I, an antimicrobial peptide derived from horseshoe crab, and lipopolysaccharide. *Biochim Biophys Acta* **1844**, 527-534.

- Kushnir, N., Streatfield, S.J., Yusibov, V. (2012) Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine* **31**, 58-83.
- Kuzmin, D.V., Emel'yanova, A.A., Kalashnikova, M.B., Panteleev, P.V., Ovchinnikova, T.V. (2018a) *In vitro* study of antitumor effect of antimicrobial peptide Tachyplesin I in combination with cisplatin. *Bull Exp Biol Med* **165**, 220-224.
- Kuzmin, D.V., Emelianova, A.A., Kalashnikova, M.B., Panteleev, P.V., Balandin, S.V., Serebrovskaya, E.O., Belogurova-Ovchinnikova, O.Y., Ovchinnikova, T.V. (2018b) Comparative *in vitro* study on cytotoxicity of recombinant beta-hairpin peptides. *Chem Biol Drug Des* **91**, 294-303.
- Kuzmin, D.V., Emelianova, A.A., Kalashnikova, M.B., Panteleev, P.V., Ovchinnikova, T.V. (2017) Effect of N- and C-terminal modifications on cytotoxic properties of antimicrobial peptide tachyplesin I. *Bull Exp Biol Med* **162**, 754-757.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Larman, H.B., Zhao, Z., Laserson, U., Li, M.Z., Ciccio, A., Gakidis, M.A., Church, G.M., Kesari, S., Leproust, E.M., Solimini, N.L., Elledge, S.J. (2011) Autoantigen discovery with a synthetic human peptidome. *Nat Biotechnol* **29**, 535-541.
- Le, D.H., Lee, K.L., Shukla, S., Commandeur, U., Steinmetz, N.F. (2017a) *Potato virus X*, a filamentous plant viral nanoparticle for doxorubicin delivery in cancer therapy. *Nanoscale* **9**, 2348-2357.
- Le, D.H.T., Hu, H., Commandeur, U., Steinmetz, N.F. (2017b) Chemical addressability of *Potato virus X* for its applications in bio/nanotechnology. *J Struct Biol* **200**, 360-368.
- Leavenworth, J.W., Tang, X., Kim, H.J., Wang, X., Cantor, H. (2013) Amelioration of arthritis through mobilization of peptide-specific CD8⁺ regulatory T cells. *J Clin Invest* **123**, 1382-1389.
- Lee, K.L., Twyman, R.M., Fiering, S., Steinmetz, N.F. (2016a) Virus-based nanoparticles as platform technologies for modern vaccines. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **8**, 554-578.
- Lee, K.L., Uhde-Holzem, K., Fischer, R., Commandeur, U., Steinmetz, N.F. (2014) Genetic engineering and chemical conjugation of *Potato virus X*. *Methods Mol Biol* **1108**, 3-21.
- Lee, L.F., Mariappan, V., Vellasamy, K.M., Lee, V.S., Vadivelu, J. (2016b) Antimicrobial activity of Tachyplesin I against *Burkholderia pseudomallei*: an *in vitro* and *in silico* approach. *PeerJ* **4**, e2468.
- Lee, P.W., Isarov, S.A., Wallat, J.D., Molugu, S.K., Shukla, S., Sun, J.E.P., Zhang, J., Zheng, Y., Lucius Dougherty, M., Konkolewicz, D., Stewart, P.L., Steinmetz, N.F., Hore, M.J.A., Pokorski, J.K. (2017) Polymer structure and conformation alter the antigenicity of virus-like particle-polymer conjugates. *J Am Chem Soc* DOI: 10.1021/jacs.6b11643.
- Lee, S.Y., Royston, E., Culver, J.N., Harris, M.T. (2005) Improved metal cluster deposition on a genetically engineered *Tobacco mosaic virus* template. *Nanotechnology* **16**, S435-441.
- Lemmens, B., De Hertogh, G., Sagaert, X. (2014) Inflammatory Bowel Diseases, in: McManus, L.M., Mitchell, R.N. (Eds.), *Pathobiology of Human Disease*. Academic Press, San Diego, pp. 1297-1304.
- Lewis, J.D., Destito, G., Zijlstra, A., González, M.J., Quigley, J.P., Manchester, M., Stuhlmann, H. (2006) Viral nanoparticles as tools for intravital vascular imaging. *Nat Med* **12**, 354-360.
- Li, H., Ding, Y., Yi, G., Zeng, Q., Yang, W. (2012) Establishment of nasal tolerance to heat shock protein-60 alleviates atherosclerosis by inducing TGF-beta-dependent regulatory T cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* **32**, 24-30.

- Li, Q., Jiang, L., Li, M., Li, P., Zhang, Q., Song, R., Xu, Z. (2007) Morphology and stability changes of recombinant TMV particles caused by a cysteine residue in the foreign peptide fused to the coat protein. *J Virol Methods* **140**, 212-217.
- Li, X., Mooney, P., Zheng, S., Booth, C.R., Braunfeld, M.B., Gubbens, S., Agard, D.A., Cheng, Y. (2013) Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM. *Nat Methods* **10**, 584-590.
- Lico, C., Benvenuto, E., Baschieri, S. (2015) The two-faced Potato virus X: From plant pathogen to smart nanoparticle. *Front Plant Sci* **6**, 1009.
- Lico, C., Capuano, F., Renzone, G., Donini, M., Marusic, C., Scaloni, A., Benvenuto, E., Baschieri, S. (2006) Peptide display on Potato virus X: molecular features of the coat protein-fused peptide affecting cell-to-cell and phloem movement of chimeric virus particles. *J Gen Virol* **87**, 3103-3112.
- Lin, A.V. (2015) Indirect ELISA. *Methods Mol Biol* **1318**, 51-59.
- Lin, T., Chen, Z., Usha, R., Stauffacher, C.V., Dai, J.B., Schmidt, T., Johnson, J.E. (1999) The refined crystal structure of Cowpea mosaic virus at 2.8 Å resolution. *Virology* **265**, 20-34.
- Lipsky, A., Joshi, J.R., Carmi, N., Yedidia, I. (2016) Expression levels of antimicrobial peptide tachyplesin I in transgenic *Ornithogalum* lines affect the resistance to *Pectobacterium* infection. *J Biotechnol* **238**, 22-29.
- Liu, Z., Habtemariam, A., Pizarro, A.M., Clarkson, G.J., Sadler, P.J. (2011) Organometallic iridium(III) cyclopentadienyl anticancer complexes containing C,N-chelating ligands. *Organometallics* **30**, 4702-4710.
- Lomonossoff, G.P., Evans, D.J. (2014) Applications of plant viruses in bionanotechnology. *Curr Top Microbiol Immunol* **375**, 61-87.
- Love, A.J., Taliansky, M.E. (2018) Propagation and isolation of Tobacco mosaic virus that surface displays metal binding and reducing peptides for generation of gold nanoparticles, in: Wege, C., Lomonossoff, G.P. (Eds.), *Virus-Derived Nanoparticles for Advanced Technologies: Methods and Protocols*. Springer New York, New York, NY, pp. 363-381.
- Lowe, C.R. (2000) Nanobiotechnology: the fabrication and applications of chemical and biological nanostructures. *Curr Opin Struct Biol* **10**, 428-434.
- Ma, Y., Nolte, R.J., Cornelissen, J.J. (2012) Virus-based nanocarriers for drug delivery. *Adv Drug Delivery Rev* **64**, 811-825.
- Manchester, M., Steinmetz, N. (2009) Viruses and Nanotechnology.
- Mangraviti, A., Gullotti, D., Tyler, B., Brem, H. (2016) Nanobiotechnology-based delivery strategies: New frontiers in brain tumor targeted therapies. *J Control Release* **240**, 443-453.
- Mañé Almero, J. (2007) Modelos experimentales in vivo de enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colorrectal: Conceptos, modelos actuales y aplicabilidad. *Nutr Hosp* **22**, 178-189.
- Mason, H.S., Ball, J.M., Shi, J.J., Jiang, X., Estes, M.K., Arntzen, C.J. (1996) Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5335-5340.
- Matsuzaki, K., Fukui, M., Fujii, N., Miyajima, K. (1991) Interactions of an antimicrobial peptide, tachyplesin I, with lipid membranes. *Biochim Biophys Acta, Biomembr* **1070**, 259-264.
- McCormick, A.A., Corbo, T.A., Wykoff-Clary, S., Nguyen, L.V., Smith, M.L., Palmer, K.E., Pogue, G.P. (2006) TMV-peptide fusion vaccines induce cell-mediated immune responses and tumor protection in two murine models. *Vaccine* **24**, 6414-6423.
- McCormick, A.A., Palmer, K.E. (2008) Genetically engineered Tobacco mosaic virus as nanoparticle vaccines. *Expert Rev Vaccines* **7**, 33-41.
- McDonald, M., Kendall, A., Bian, W., McCullough, I., Lio, E., Havens, W.M., Ghabrial, S.A., Stubbs, G. (2010) Architecture of the potyviruses. *Virology* **405**, 309-313.

- Mejáre, M., Bülow, L. (2001)** Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends Biotechnol* **19**, 67-73.
- Meng, Q., Li, B.X., Xiao, X. (2018)** Toward developing chemical modulators of Hsp60 as potential therapeutics. *Front Mol Biosci* **5**, 35.
- Murawski, M.R., McGinnes, L.W., Finberg, R.W., Kurt-Jones, E.A., Massare, M.J., Smith, G., Heaton, P.M., Fraire, A.E., Morrison, T.G. (2010)** Newcastle disease virus-like particles containing respiratory syncytial virus G protein induced protection in BALB/c mice, with no evidence of immunopathology. *J Virol* **84**, 1110-1123.
- Namba, K., Pattanayek, R., Stubbs, G. (1989)** Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus. Refined structure of intact *Tobacco mosaic virus* at 2.9 Å resolution by X-ray fiber diffraction. *J Mol Biol* **208**, 307-325.
- Narayanan, K.B., Han, S.S. (2017)** Icosahedral plant viral nanoparticles - bioinspired synthesis of nanomaterials/nanostructures. *Adv Colloid Interface Sci* **248**, 1-19.
- Nazzi, E., Merlin, M., Basoni, C., Ben, R., Zampieri, R., Lico, C., Bartoloni, E., Puccetti, A., Lunardil, C., Pezzotti, M., Avesani, L. (2015)** Plant-Derived Chimeric Virus Particles for the Diagnosis of Primary Sjogren Syndrome. *Front Plant Sci* **6**, 11.
- Ohta, M., Ito, H., Masuda, K., Tanaka, S., Arakawa, Y., Wacharotayankun, R., Kato, N. (1992)** Mechanisms of antibacterial action of tachyplesins and polyphemusins, a group of antimicrobial peptides isolated from horseshoe crab hemocytes. *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 1460-1465.
- Omi, K., Ando, T., Sakyu, T., Shirakawa, T., Uchida, Y., Oka, A., Ise, N., Aoyagi, K., Goishi, K. (2015)** Noncompetitive immunoassay detection system for haptens on the basis of antimetatype antibodies. *Clin Chem* **61**, 627-635.
- Papuc, E., Krupski, W., Kurys-Denis, E., Rejdak, K. (2016)** Antibodies against small heat-shock proteins in Alzheimer's disease as a part of natural human immune repertoire or activation of humoral response? *J Neural Transm (Vienna)* **123**, 455-461.
- Park, J., Gao, H., Wang, Y., Hu, H., Simon, D.I., Steinmetz, N.F. (2019)** S100A9-targeted *Tobacco mosaic virus* nanoparticles exhibit high specificity toward atherosclerotic lesions in ApoE^{-/-} mice. *Journal of Materials Chemistry B* **7**, 1842-1846.
- Peabody, D.S., Manifold-Wheeler, B., Medford, A., Jordan, S.K., Caldeira, J.d.C., Chackerian, B. (2008)** Immunogenic display of diverse peptides on virus-like particles of RNA phage MS2. *J Mol Biol* **380**, 252-263.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E. (2004)** UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605-1612.
- Pinar, O., Ozden, Y.A., Omur, E., Muhtesem, G. (2017)** Heat shock proteins in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis: Bench to Bedside: Global Perspectives on a Silent Killer* **958**, 29-42.
- Pintilie, G.D., Zhang, J., Goddard, T.D., Chiu, W., Gossard, D.C. (2010)** Quantitative analysis of cryo-EM density map segmentation by watershed and scale-space filtering, and fitting of structures by alignment to regions. *J Struct Biol* **170**, 427-438.
- Pitek, A.S., Hu, H., Shukla, S., Steinmetz, N.F. (2018)** Cancer theranostic applications of albumin-coated *Tobacco mosaic virus* nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces* **10**, 39468-39477.
- Pitek, A.S., Jameson, S.A., Veliz, F.A., Shukla, S., Steinmetz, N.F. (2016)** Serum albumin 'camouflage' of plant virus based nanoparticles prevents their antibody recognition and enhances pharmacokinetics. *Biomaterials* **89**, 89-97.
- Plummer, E.M., Manchester, M. (2011)** Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **3**, 174-196.

- Pokorski, J.K., Steinmetz, N.F. (2011)** The art of engineering viral nanoparticles. *Mol Pharm* **8**, 29-43.
- Poletaev, A., Osipenko, L. (2003)** General network of natural autoantibodies as immunological homunculus (Immunculus). *Autoimmun Rev* **2**, 264-271.
- Ponnusamy, T., Venkatachala, S.K., Ramanjappa, M., Kakkar, V.V., Mundkur, L.A. (2018)** Inverse association of ApoB and HSP60 antibodies with coronary artery disease in Indian population. *Heart Asia* **10**, e011018.
- Poole, L.B. (2015)** The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radic Biol Med* **80**, 148-157.
- Porta, C., Spall, V.E., Findlay, K.C., Gergerich, R.C., Farrance, C.E., Lomonossoff, G.P. (2003)** Cowpea mosaic virus-based chimaeras - Effects of inserted peptides on the phenotype, host range, and transmissibility of the modified viruses. *Virology* **310**, 50-63.
- Quintana, F.J., Cohen, I.R. (2011)** The HSP60 immune system network. *Trends Immunol* **32**, 89-95.
- Quintana, F.J., Farez, M.F., Viglietta, V., Iglesias, A.H., Merbl, Y., Izquierdo, G., Lucas, M., Basso, A.S., Khoury, S.J., Lucchinetti, C.F., Cohen, I.R., Weiner, H.L. (2008)** Antigen microarrays identify unique serum autoantibody signatures in clinical and pathologic subtypes of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 18889-18894.
- Rajesh Kannan, V., Bastas, K.K., Rajendran, S. (2015)** Scientific and economic impact of plant pathogenic bacteria, pp. 369-392.
- Ramakrishnan, S.K., Fernandez, M.M., Cloitre, T., Agarwal, V., Cuisinier, F.J.G., Gergely, C. (2018)** Porous silicon microcavities redefine colorimetric ELISA sensitivity for ultrasensitive detection of autoimmune antibodies. *Sens Actuator B-Chem* **272**, 211-218.
- Rawtani, D., Khatri, N., Tyagi, S., Pandey, G. (2018)** Nanotechnology-based recent approaches for sensing and remediation of pesticides. *J Environ Manage* **206**, 749-762.
- Rohou, A., Grigorieff, N. (2015)** CTFFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs. *J Struct Biol* **192**, 216-221.
- Rohovie, M.J., Nagasawa, M., Swartz, J.R. (2017)** Virus-like particles: Next-generation nanoparticles for targeted therapeutic delivery. *Bioeng Transl Med* **2**, 43-57.
- Rong, J., Oberbeck, F., Wang, X., Li, X., Oxsher, J., Niu, Z., Wang, Q. (2009)** Tobacco mosaic virus templated synthesis of one dimensional inorganic-polymer hybrid fibres. *J Mater Chem* **19**, 2841-2845.
- Rose, N.R., Mackay, I.R. (2014)** Chapter 1 - Autoimmune disease: The consequence of disturbed homeostasis, in: Rose, N.R., Mackay, I.R. (Eds.), *The Autoimmune Diseases* (Fifth Edition). Academic Press, Boston, pp. 3-9.
- Royston, E., Ghosh, A., Kofinas, P., Harris, M.T., Culver, J.N. (2008)** Self-assembly of virus-structured high surface area nanomaterials and their application as battery electrodes. *Langmuir* **24**, 906-912.
- Royston, E.S., Brown, A.D., Harris, M.T., Culver, J.N. (2009)** Preparation of silica stabilized Tobacco mosaic virus templates for the production of metal and layered nanoparticles. *J Colloid Interface Sci* **332**, 402-407.
- Sachse, C., Chen, J.Z., Coureux, P.D., Stroupe, M.E., Fandrich, M., Grigorieff, N. (2007)** High-resolution electron microscopy of helical specimens: a fresh look at Tobacco mosaic virus. *J Mol Biol* **371**, 812-835.
- Sainsbury, F., Lomonossoff, G.P. (2008)** Extremely high-level and rapid transient protein production in plants without the use of viral replication. *Plant Physiol* **148**, 1212-1218.
- Sainsbury, F., Thuenemann, E.C., Lomonossoff, G.P. (2009)** pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnol J* **7**, 682-693.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989)** Molecular cloning: A Laboratory manual, 2nd Edn. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sánchez-Sánchez, L., Cadena-Nava, R.D., Palomares, L.A., Ruiz-García, J., Koay, M.S., Cornelissen, J.J., Vázquez-Duhalt, R. (2014)** Chemotherapy pro-drug activation by biocatalytic virus-like nanoparticles containing cytochrome P450. *Enzyme Microb Technol* **60**, 24-31.
- Sánchez, F., Martínez-Herrera, D., Aguilar, I., Ponz, F. (1998)** Infectivity of turnip mosaic potyvirus cDNA clones and transcripts on the systemic host *Arabidopsis thaliana* and local lesion hosts. *Virus Res* **55**, 207-219.
- Sánchez, F., Sáez, M., Lunello, P., Ponz, F. (2013)** Plant viral elongated nanoparticles modified for log-increases of foreign peptide immunogenicity and specific antibody detection. *J Biotechnol* **168**, 409-415.
- Savary, S., Ficke, A., Aubertot, J.-N., Hollier, C. (2012)** Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Security* **4**, 519-537.
- Schilling, C.I., Jung, N., Biskup, M., Schepers, U., Brase, S. (2011)** Bioconjugation via azide-Staudinger ligation: an overview. *Chem Soc Rev* **40**, 4840-4871.
- Seleci, M., Ag Seleci, D., Jonczyk, R., Stahl, F., Blume, C., Scheper, T. (2016)** Smart multifunctional nanoparticles in nanomedicine. *BioNanoMat* **17**, 33-41.
- Selli, M.E., Wick, G., Wraith, D.C., Newby, A.C. (2017)** Autoimmunity to HSP60 during diet induced obesity in mice. *Int J Obes (Lond)* **41**, 348-351.
- Shi, J., So, L.Y., Chen, F., Liang, J., Chow, H.Y., Wong, K.Y., Wan, S., Jiang, T., Yu, R. (2018)** Influences of disulfide connectivity on structure and antimicrobial activity of tachyplesin I. *J Pept Sci* **24**, e3087.
- Shiba, K. (2010)** Exploitation of peptide motif sequences and their use in nanobiotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **21**, 412-425.
- Shukla, D.D., Strike, P.M., Tracy, S.L., Gough, K.H., Ward, C.W. (1988)** The N-termini and C-termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N-terminus contains the major virus-specific epitopes. *J Gen Virol* **69**, 1497-1508.
- Shukla, D.D., Tribbick, G., Mason, T.J., Hewish, D.R., Geysen, H.M., Ward, C.W. (1989)** Localization of virus-specific and group-specific epitopes of plant potyviruses by systematic immunochemical analysis of overlapping peptide fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8192-8196.
- Shukla, D.D., Ward, C.W. (1988)** Amino-acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the potyvirus group. *J Gen Virol* **69**, 2703-2710.
- Shukla, D.D., Ward, C.W., Brunt, A.A. (1994)** The Potyviridae. CAB INTERNATIONAL, Wallingford.
- Shukla, S., Ablack, A.L., Wen, A.M., Lee, K.L., Lewis, J.D., Steinmetz, N.F. (2013)** Increased tumor homing and tissue penetration of the filamentous plant viral nanoparticle *Potato virus X*. *Mol Pharm* **10**, 33-42.
- Shukla, S., Jandzinski, M., Wang, C., Gong, X., Bonk, K.W., Keri, R.A., Steinmetz, N.F. (2019)** A viral nanoparticle cancer vaccine delays tumor progression and prolongs survival in a HER2+ tumor mouse model. *Advanced Therapeutics* **xxx**, 1800139.
- Shukla, S., Wen, A.M., Ayat, N.R., Commandeur, U., Gopalkrishnan, R., Broome, A.-M., Lozada, K.W., Keri, R.A., Steinmetz, N.F. (2014)** Biodistribution and clearance of a filamentous plant virus in healthy and tumor-bearing mice. *Nanomedicine* **9**, 221-235.
- Simón-Vázquez, R., Peleteiro, M., Lozano, T., González-Fernández, Á., Casal, A. (2012)** Chapter 15 - Nanotoxicology, in: Jesus, M.d.I.F., Grazu, V. (Eds.), *Frontiers of Nanoscience*. Elsevier, pp. 443-485.
- Smith, M.L., Lindbo, J.A., Dillard-Telm, S., Brosio, P.M., Lasnik, A.B., McCormick, A.A., Nguyen, L.V., Palmer, K.E. (2006)** Modified Tobacco mosaic virus particles as

- scaffolds for display of protein antigens for vaccine applications. *Virology* **348**, 475-488.
- Sobczak, M., Fabisiak, A., Murawska, N., Wesółowska, E., Wierzbicka, P., Wlazłowski, M., Wójcikowska, M., Zatorski, H., Zwolińska, M., Fichna, J. (2014)** Current overview of extrinsic and intrinsic factors in etiology and progression of inflammatory bowel diseases. *Pharmacol Rep* **66**, 766-775.
- Soriano, L.M., Zougagh, M., Valcarcel, M., Rios, A. (2018)** Analytical nanoscience and nanotechnology: where we are and where we are heading. *Talanta* **177**, 104-121.
- Spence, N.J. (1992)** The identification, distribution and ecology of bean common mosaic virus in Africa. University of Birmingham, UK., Birmingham.
- Stanley, S. (2014)** Biological nanoparticles and their influence on organisms. *Curr Opin Biotechnol* **28**, 69-74.
- Steele, J.F.C., Peyret, H., Saunders, K., Castells-Graells, R., Marsian, J., Meshcheriakova, Y., Lomonossoff, G.P. (2017)** Synthetic plant virology for nanobiotechnology and nanomedicine. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol* **9**, e1447.
- Steinmetz, N.F. (2010)** Viral nanoparticles as platforms for next-generation therapeutics and imaging devices. *Nanomedicine* **6**, 634-641.
- Steinmetz, N.F., Mertens, M.E., Taurog, R.E., Johnson, J.E., Commandeur, U., Fischer, R., Manchester, M. (2010)** Potato virus X as a novel platform for potential biomedical applications. *Nano Lett* **10**, 305-312.
- Strable, E., Finn, M.G. (2009)** Chemical modification of viruses and virus-like particles, in: Manchester, M., Steinmetz, N.F. (Eds.), *Viruses and Nanotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1-21.
- Stubbs, G., Kendall, A., McDonald, M., Bian, W., Bowles, T., Bian, W., McCullough, I., Shi, J., Stewart, P., Bullitt, E., Gore, D., Ghabrial, S.A. (2008)** Flexible filamentous virus structures from fiber diffraction. *Powder Diffr* **23**, 113-117.
- Tam, A., Raines, R.T. (2009)** Chapter 2: Protein engineering with the traceless Staudinger ligation. *Methods Enzymol* **462**, 25-44.
- Tanaka, K., Chujo, Y. (2014)** Design of functionalized nanoparticles for the applications in nanobiotechnology. *Adv Powder Technol* **25**, 101-113.
- Tang, F., Li, L., Chen, D. (2012)** Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery. *Adv Mater* **24**, 1504-1534.
- Tarhini, M., Greige-Gerges, H., Elaissari, A. (2017)** Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules. *Int J Pharm* **522**, 172-197.
- Therien, A., Bedard, M., Carignan, D., Rioux, G., Gauthier-Landry, L., Laliberte-Gagne, M.E., Bolduc, M., Savard, P., Leclerc, D. (2017)** A versatile Papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform based on sortase-mediated antigen coupling. *J Nanobiotechnology* **15**, 54.
- Tissot, A.C., Renhofs, R., Schmitz, N., Cielens, I., Meijerink, E., Ose, V., Jennings, G.T., Saudan, P., Pumpens, P., Bachmann, M.F. (2010)** Versatile virus-like particle carrier for epitope based vaccines. *PLoS ONE* **5**, e9809.
- Tomasello, G., Sciume, C., Rappa, F., Rodolico, V., Zerilli, M., Martorana, A., Cicero, G., De Luca, R., Damiani, P., Accardo, F.M., Romeo, M., Farina, F., Bonaventura, G., Modica, G., Zummo, G., Conway de Macario, E., Macario, A.J., Cappello, F. (2011)** Hsp10, Hsp70, and Hsp90 immunohistochemical levels change in ulcerative colitis after therapy. *Eur J Histochem* **55**, e38.
- Tomlinson, J.A., Ward, C.M. (1978)** The reactions of swede (*Brassica napus*) to infection by turnip mosaic virus. *Ann Appl Biol* **89**, 61-69.
- Torres, M.D.T., SothiSelvam, S., Lu, T.K., de la Fuente-Nunez, C. (2019)** Peptide design principles for antimicrobial applications. *J Mol Biol* **xxx**, 1-21.
- Touriño, A., Sánchez, F., Fereres, A., Ponz, F. (2008)** High expression of foreign proteins from a biosafe viral vector derived from Turnip mosaic virus. *Span J Agric Res* **6**, 48-58.

- Trabulo, S., Aires, A., Aicher, A., Heeschen, C., Cortajarena, A.L. (2017) Multifunctionalized iron oxide nanoparticles for selective targeting of pancreatic cancer cells. *Biochim Biophys Acta* **1861**, 1597-1605.
- Uhlén, M., Forsberg, G., Moks, T., Hartmanis, M., Nilsson, B. (1992) Fusion proteins in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **3**, 363-369.
- Ulmansky, R., Landstein, D., Moallem, E., Loeb, V., Levin, A., Meyuhas, R., Katzavian, G., Yair, S., Naparstek, Y. (2015) A humanized monoclonal antibody against Heat Shock Protein 60 suppresses murine arthritis and colitis and skews the cytokine balance toward an anti-inflammatory response. *J Immunol* **194**, 5103-5109.
- Ulmansky, R., Naparstek, Y. (2018) Protective antibodies against HSP60 for autoimmune inflammatory diseases. *Clin Immunol* **186**, 63.
- Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A.L., Bernardi, F. (2001) Potyvirus proteins: A wealth of functions. *Virus Res* **74**, 157-175.
- Vallhov, H., Gabrielsson, S., Stromme, M., Scheynius, A., Garcia-Bennett, A.E. (2007) Mesoporous silica particles induce size dependent effects on human dendritic cells. *Nano Lett* **7**, 3576-3582.
- van Eden, W., van Herwijnen, M., Wagenaar, J., van Kooten, P., Broere, F., van der Zee, R. (2013) Stress proteins are used by the immune system for cognate interactions with anti-inflammatory regulatory T cells. *FEBS Lett* **587**, 1951-1958.
- Voloudakis, A.E., Aleman-Verdaguer, M.E., Padgett, H.S., Beachy, R.N. (2005) Characterization of resistance in transgenic *Nicotiana benthamiana* encoding N-terminal deletion and assembly mutants of the tobacco etch potyvirus coat protein. *Arch Virol* **150**, 2567-2582.
- Wang, C., Fiering, S.N., Steinmetz, N.F. (2019) Cowpea mosaic virus promotes anti-tumor activity and immune memory in a mouse ovarian tumor model. *Advanced Therapeutics* **xxx**, 1900003.
- Wang, H., Stubbs, G. (1994) Structure determination of Cucumber green mottle mosaic virus by X-ray fiber diffraction. *J Mol Biol* **239**, 371-384.
- Wang, J.J., Sanderson, B.J., Wang, H. (2007) Cytotoxicity and genotoxicity of ultrafine crystalline SiO₂ particulate in cultured human lymphoblastoid cells. *Environ Mol Mutagen* **48**, 151-157.
- Wang, K., Kievit, F.M., Zhang, M. (2016) Nanoparticles for cancer gene therapy: Recent advances, challenges, and strategies. *Pharmacol Res* **114**, 56-66.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* **46**, W296-w303.
- Wen, A.M., Infusino, M., De Luca, A., Kernan, D.L., Czapar, A.E., Strangi, G., Steinmetz, N.F. (2015) Interface of physics and biology: engineering virus-based nanoparticles for biophotonics. *Bioconjug Chem* **26**, 51-62.
- Wen, A.M., Rambhia, P.H., French, R.H., Steinmetz, N.F. (2013) Design rules for nanomedical engineering: from physical virology to the applications of virus-based materials in medicine. *J Biol Syst* **39**, 301-325.
- Whitesides, G.M. (2003) The "right" size in nanobiotechnology. *Nat Biotechnol* **21**, 1161.
- WHO (2018) Antimicrobial resistance, World Health Organization, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.
- Wylie, S.J., Adams, M., Chalam, C., Kreuze, J., Lopez-Moya, J.J., Ohshima, K., Praveen, S., Rabenstein, F., Stenger, D., Wang, A., Zerbini, F.M., Ictv Report, C. (2017) ICTV virus taxonomy profile: Potyviridae. *J Gen Virol* **98**, 352-354.
- Xie, H., Wei, J., Qin, Q. (2016) Antiviral function of Tachyplesin I against iridovirus and nodavirus. *Fish Shellfish Immunol* **58**, 96-102.
- Yang, S., Wang, T., Bohon, J., Gagne, M.E., Bolduc, M., Leclerc, D., Li, H. (2012) Crystal structure of the coat protein of the flexible filamentous Papaya mosaic virus. *J Mol Biol* **422**, 263-273.

- Yildiz, I., Lee, K.L., Chen, K., Shukla, S., Steinmetz, N.F. (2013)** Infusion of imaging and therapeutic molecules into the plant virus-based carrier cowpea mosaic virus: cargo-loading and delivery. *J Control Release* **172**, 568-578.
- Yildiz, I., Shukla, S., Steinmetz, N.F. (2011)** Applications of viral nanoparticles in medicine. *Curr Opin Biotechnol* **22**, 901-908.
- Zamora, M., Méndez-López, E., Agirrezabala, X., Cuesta, R., Lavín, J.L., Sánchez-Pina, M.A., Aranda, M.A., Valle, M. (2017)** Potyvirus virion structure shows conserved protein fold and RNA binding site in ssRNA viruses. *Sci Adv* **3**, eaao2182.
- Zdanowicz, M., Chroboczek, J. (2016)** Virus-like particles as drug delivery vectors. *Acta Biochim Pol* **63**, 469-473.
- Zeltins, A. (2013)** Construction and characterization of virus-like particles: a review. *Mol Biotechnol* **53**, 92-107.
- Zhang, R., Liu, Y., Xing, L., Zhao, N., Zheng, Q., Li, J., Bao, J. (2018)** The protective role of selenium against cadmium-induced hepatotoxicity in laying hens: Expression of Hsps and inflammation-related genes and modulation of elements homeostasis. *Ecotoxicol Environ Saf* **159**, 205-212.
- Zhao, Y., Zhang, X. (2007)** Nanobiotechnology: An engineer's foray into biology. *Adv Comput* **71**, 39-102.
- Zheng, L., Wayper, P.J., Gibbs, A.J., Fourment, M., Rodoni, B.C., Gibbs, M.J. (2008)** Accumulating variation at conserved sites in potyvirus genomes is driven by species discovery and affects degenerate primer design. *PLoS One* **3**, e1586.
- Zhong, Y., Tang, H., Wang, X., Zeng, Q., Liu, Y., Zhao, X.L., Yu, K., Shi, H., Zhu, R., Mao, X. (2016)** Intranasal immunization with heat shock protein 60 induces CD4(+) CD25(+) GARP(+) and type 1 regulatory T cells and inhibits early atherosclerosis. *Clin Exp Immunol* **183**, 452-468.